



# Die Rolle des sympathischen Nervensystems in der Antigen-induzierten Arthritis der Maus

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem  
**Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät**  
der  
**Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von  
**Dipl.-Biol. Matthias Ebbinghaus**  
geboren am 01. Januar 1981 in Jena

## GUTACHTER:

### **1. Prof. Dr. rer. nat. Rolf Bräuer**

Institut für Pathologie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena

### **2. Prof. Dr. med. Hans-Georg Schaible**

Institut für Physiologie I, Friedrich-Schiller-Universität, Jena

### **3. Prof. Dr. med. Ulf Wagner**

Medizinische Klinik IV, Universität Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 25.10.2010

„Eine Katze in Handschuhen fängt keine Mäuse“



**Benjamin Franklin** (1706 – 1790)  
US-amerikanischer Politiker &  
Naturwissenschaftler

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	I
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	IV
<b>Zusammenfassung</b>	VI
<b>1. Einleitung</b>	1
<b>1.1 Die Rheumatoide Arthritis</b>	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Diagnose und Symptome	2
1.1.3 Ätiologie	3
1.1.4 Pathogenese	4
1.1.5 Therapie	7
<b>1.2 Experimentelle Arthritismodelle</b>	9
1.2.1 Allgemeines	9
1.2.2 Antigen-induzierte Arthritis	10
<b>1.3 Das Nervensystem</b>	11
1.3.1 Das vegetative Nervensystem	11
1.3.2 Neuroimmunologie des sympathischen Nervensystems	16
1.3.3 Nozizeption und Schmerz	18
1.3.4 Arthrogener Schmerz	19
<b>1.4 Ziel der Arbeit</b>	21
<b>2. Material und Methoden</b>	23
<b>2.1 Material</b>	23
2.1.1 Mäusestämme	23
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3 Reagenzien, Puffer, Kulturmedien	24
<b>2.2 Methoden</b>	27
2.2.1 Modell der Antigen-induzierten Arthritis	27
2.2.2 Klinische Bewertung der AIA	28
2.2.3 Applikation von Wirkstoffen	30
2.2.4 Bestimmung des Noradrenalingehalts im Milzgewebe	30
2.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford)	31
2.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
2.2.7 Western Blot	32



2.2.8 Nachweis von Zytokinen	33
2.2.9 Bestimmung von Antikörpern	35
2.2.10 Test der Vitalität der T-Zellen	36
2.2.11 Quantifizierung der Proliferation der T-Zellen	36
2.2.12 Makrophagenpräparation und -kultur	37
2.2.13 Messung des Aktivitätszustandes der Makrophagen - NO-Test	38
2.2.14 Erfassung von Schmerzschwellen	38
2.2.15 Statistische Auswertung und Darstellung	40
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Wirkungsnachweis der chemischen Sympathektomie</b>	<b>41</b>
3.1.1 Zusammenfassung	43
<b>3.2 Einfluss der Sympathektomie auf den Verlauf der AIA <i>in vivo</i></b>	<b>44</b>
3.2.1 Zeitpunkt und Konzentration	44
3.2.2 Charakterisierung der akuten Phase (d3)	48
3.2.2.1 Arthritisverlauf	48
3.2.2.2 Immunparameter	50
3.2.3 Sympathektomie in der chronischen Phase der AIA	54
3.2.4 Sympathektomie und Flare-up-Reaktion (d21)	55
3.2.5 Einfluss von Bupropion auf die Gelenkschwellung	58
3.2.6 Zusammenfassung	59
<b>3.3 Nozizeptives Verhalten im Verlauf der AIA</b>	<b>60</b>
3.3.1 Mechanische Hyperalgesie	60
3.3.2 Thermische Hyperalgesie	62
3.3.3 Relevanz des Sympathektomie-Schemas im nozizeptiven Verhalten	63
3.3.4 Zusammenfassung	65
<b>3.4 Agonisten und Antagonisten der Adrenozeptoren</b>	<b>66</b>
3.4.1 Wirkung von Adrenozeptor-Antagonisten auf die AIA	66
3.4.2 Zusammenwirken mit der chemischen Sympathektomie	68
3.4.3 Beeinflussung der Lymphozytenaktivität	69
3.4.4 Einfluss auf die Makrophagenaktivität	72
3.4.4.1 Aktivitätszustand der Makrophagen	72
3.4.4.2 Zytokinproduktion der Makrophagen	75
3.4.5 Zusammenfassung	78

<b>4. Diskussion</b>	80
4.1 Die chemische Sympathektomie mit 6-Hydroxydopamin	80
4.2 Der Einfluss des SNS auf den Verlauf der AIA	82
4.3 Der Einfluss der Adrenozeptoren auf die Immunparameter	90
4.4 Das nozizeptive Verhalten im Verlauf der AIA	95
4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick	97
 <b>5. Literaturverzeichnis</b>	 99
 <b>6. Anhang</b>	 111
Abbildungen	111
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	112
Danksagung	114
Erklärungen	115

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	DMARDs	Disease modifying anti-rheumatic drugs
-/-	Gen-knockout		
°C	Grad Celsius	DNA	Desoxyribonukleinsäure
μ	mikro	DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
6-OHDA	6-Hydroxydopamin	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
A	Ampere	ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
AA	Adjuvans-Arthritis		
Abb.	Abbildung	ERK	Extracellular signal regulated kinase
Ach	Acetylcholin		
ACR	American College of Rheumatology	et al.	[lateinisch] <i>und andere</i>
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	FCS	Fetal calf serum
Ag	Agonist	FSU	Friedrich-Schiller-Universität
AIA	Antigen-induzierte Arthritis	g	Gramm
Ant	Antagonist	GALT	Gut-associated lymphoid tissue
AP	Alkalische Phosphatase	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
AR	Adrenozeptor	GCH1	GTP-cyclohydrolase
ATP	Adenosintriphosphat	GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
BAFF	B-cell activating factor	GPI	Glukose-6-Phosphat-Isomerase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	h	Stunde
CD	Cluster of differentiation	HE	Hämatoxilin-Eosin
CFA	Complete Freund's adjuvans	HLA	Human leucocyte antigen
CGRP	Calcitonin gene-related peptide	HPLC	High performance liquide chromatography
CH65	Chondrozytenmembran-Protein	HSP65	Hitzeschockprotein 65
ChAT	Cholinacetyltransferase	IASP	International Association for the Study of Pain
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis		
COMT	Catechol-O-Methyltransferase	i.a.	intraartikulär
COX	Cyclooxygenase	i.p.	intraperitoneal
cpm	Counts per minute	IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
CRH	Corticotropin releasing hormon	Ig	Immunglobulin
CXCL	CXC chemokine ligand	IL	Interleukin
CXCR	CXC chemokine receptor	k	kilo
d	Tag	K I/II	Kollagen Typ I/II
DBH	Dopamin-beta-Hydroxylase	kDa	kilo-Dalton
DC	dendritische Zelle	l	Liter

L	Ligand	SEM	Standard error mean
LPS	Lipopolysaccharid	SFB	synovialer Fibroblast
M	Molarität (mol/l)	SFM	serumfreies Makrophagen- medium
m	milli	SM	Synovialmembran
MAP	Mitogen-activated protein	SNPs	Single nucleotid polymorphism
mBSA	methyliertes bovines Serum- Albumin	SNS	sympathisches Nervensystem
MHC	Major histocompatibility complex	Tab.	Tabelle
MMP	Matrixmetalloprotease	TBS	Tris-buffered saline
MØ	Makrophage	TCR	T-cell receptor
mol	Mol	TEMED	Tetramethylethylendiamin
n	nano	TGF	Transforming growth factor
n.s.	nicht-selektiv	Th	T-Helfer-Zelle
NA	Noradrenalin	TNF	Tumornekrosefaktor
NDRI	Noradrenalin-Dopamin Wieder- aufnahmehemmer	T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
NO	Stickoxid	TRIS	Tris(hydroxymethyl)- Aminomethan
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs	TRPV1	Vanilloid-Rezeptor 1
OPD	Ortho-Phenyldiamin	U	Unit
p	piko	U/min	Umdrehung pro Minute
PBS	Phosphate-buffered saline	VCAM	Vascular cell adhesion molecule
PG	Proteoglykane	VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
PMA	Phorbol 12-myristate 13- acetate	ZNS	Zentralnervensystem
pNPP	Para-Nitrophenylphosphat		
PNS	peripheres Nervensystem		
PO	Peroxidase		
PVDF	Polyvinylidenfluorid		
RA	rheumatoide Arthritis		
RANK	Receptor activator of NF-κB		
RANTES	Chemokine ligand 5		
RPMI	Roswell Park Memorial Institute		
rm	rekombinant murin		
s.c.	subkutan		
SDS	Sodium dodecyl sulfate		
Sek.	Sekunde		

## Zusammenfassung

Die Einflussnahme des sympathischen Nervensystems (SNS) auf Autoimmunerkrankungen rückte in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Forschung. Experimentelle Modelle der rheumatoiden Arthritis (RA) stellen dafür geeignete Untersuchungssysteme dar. Bislang konnte jedoch die neuroimmunologische Interaktion noch nicht im Allgemeinen beschrieben werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Einflussnahme des SNS im murinen Modell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) zu charakterisieren. Hierfür sollten sowohl die Entzündungsparameter als auch das nozizeptive Verhalten und die Veränderungen auf zellulärer Ebene analysiert werden.

Die chemische Sympathektomie durch das Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) stellt eine zweckmäßige Methode zur peripheren Denervation dar. Der Gehalt an Noradrenalin (NA) und Tyrosin-Hydroxylase, dem Schlüsselenzym der NA-Synthese, wurde dabei in den sekundären lymphatischen Organen signifikant verringert. Im Zuge der Sympathektomie wurden weder das Milzgewicht, noch die Zahl der Lymphozyten und deren Proliferationsfähigkeit reduziert, was den Erhalt der organspezifischen Funktionalität verdeutlicht.

Der Einfluss des Sympathikus auf die Schwere der AIA wurde in der akuten und chronischen Entzündungsphase sowie in der Flare-up-Reaktion untersucht. Dafür wurden klinische als auch immunologische Parameter bestimmt. Die Applikation von 6-OHDA zum Zeitpunkt des Auslösens der Arthritis an den Tagen d-1 – d1 konnte die Gelenkschwellung in der akuten Phase um ~50% senken. Im histologischen Bild wurde dieser Befund durch eine geringere granulozytäre und mononukleäre Infiltration sowie eine schwächere synoviale Hyperplasie in den Gelenken der sympathektomierten Tiere bestätigt. Ebenso wurden die Konzentrationen der Th1-Zell-vermittelten antigenspezifischen Immunglobuline IgG2a und IgG2b als auch der Auto-Antikörper gegen Kollagen Typ I, II und Proteoglykane reduziert. Im Zytokinprofil der Lymphozyten war zudem ein umfassend hemmender Einfluss der Sympathektomie festzustellen. Neben Interleukin (IL)-2, 4, 6 und TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) wurden in besonderem Maß die Mengen des proinflammatorischen IL-17 und des regulatorisch wirkenden Interferon- $\gamma$  signifikant verringert. Diesen beiden Zytokinen wird die Funktion zugesprochen, im Allgemeinen den Verlauf der AIA wesentlich mitzubestimmen. Im Gegensatz hierzu konnte in der chronischen Entzündungsphase kein Einfluss des Sympathikus nachgewiesen werden. Die Denervation in diesem späten symptomatischen Stadium der AIA veränderte den Verlauf der Gelenkschwellung nicht. Jedoch wurde auch in der Flare-up-Reaktion, die als akute Entzündung nach erneutem Antigen-

Kontakt am Tag 21 den akuten Schüben der rheumatoiden Arthritis ähnelt, die Gelenkschwellung in Folge der Sympathektomie signifikant vermindert.

Inwiefern der Einfluss des Sympathikus auf die AIA über die Noradrenalin-Rezeptoren (Adrenozeptoren) vermittelt wird, war anschließend das Ziel der Untersuchungen. Hierfür wurden Agonisten und Antagonisten der Adrenozeptoren verwendet. Dabei konnte *in vivo* gezeigt werden, dass  $\beta_2$ -Blocker die Schwere der Gelenkschwellung in der akuten AIA-Phase am effektivsten senken können. Die Rolle der Adrenozeptoren auf zellulärer Ebene wurde im Folgenden an Lymphozyten und Makrophagen *in vitro* analysiert. Während  $\beta$ -Antagonisten, die die Signaltransduktion des Sympathikus hemmen, die Vitalität und Proliferationsrate von Lymphozyten sowie den Aktivitätszustand der Makrophagen schwächen, übt der  $\beta$ -Agonist Isoproterenol in niedrigen Dosen einen stimulierenden Effekt aus. Des Weiteren können diese Pharmaka das Zytokinprofil der Makrophagen modulieren. Sowohl  $\beta$ -Antagonisten als auch  $\beta$ -Agonisten reduzieren die Menge entzündungshemmender Zytokine (IL-10, IL-12) und stimulieren die Freisetzung des pro-inflammatorischen IL-1 $\beta$  und IL-6.

Da Schmerzen zu den bedeutenden Symptomen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis zählen, wurde bei den Versuchstieren neben den zuvor beschriebenen Immunparametern auch das nozizeptives Verhalten untersucht. Im Verlauf der AIA verringert sich die nozizeptive Schwelle auf mechanische und thermische Stimuli an der Fußsohle um bis zu 50%. Die Abnahme der Latenzzeit konnte durch die chemische Sympathektomie in der akuten Phase reduziert werden, was einer geringeren sekundären Hyperalgesie entspricht. Ebenso ist diese Wirkung in der Flare-up-Reaktion erkennbar.

Zusammenfassend kann aufgrund dieser Ergebnisse angenommen werden, dass das SNS einen umfassend pro-inflammatorischen Einfluss auf die akute Phase der AIA ausübt. Sowohl die Effektormechanismen der humoralen als auch der zellulären Immunabwehr werden dabei moduliert. Die entzündungshemmende Wirkung der Sympathektomie führt somit zu einem mildereren Krankheitsverlauf. Diese Ergebnisse sind spezifisch für die AIA und unterscheiden sich zu anderen tierexperimentellen Arthritismodellen. Die Annahme, dass die Wechselwirkung zwischen Immun- und Nervensystem eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der RA einnehmen kann, wird hierdurch bekräftigt und eröffnet perspektivisch neue Therapieansätze.

# 1. Einleitung

Bereits zu Anfang des 20. Jahrhunderts konnte Tohru Ishigami einen ersten Zusammenhang zwischen Neurologie und Immunologie nachweisen. In seinen Arbeiten aus dem Jahr 1919 zeigte er, dass psychisch belastete Patienten eine herabgesetzte Infektionsabwehr besaßen und häufiger an Tuberkulose erkrankten<sup>67</sup>. Davon abgeleitet befasst sich die Neuroimmunologie heutzutage mit dem wechselseitigen Dialog zwischen Immunsystem, Hormonsystem sowie zentralem und peripheren Nervensystem. Die Integration der verschiedenen Organsysteme wurde lange Zeit wissenschaftlich abgelehnt und erst die modernen molekularbiologischen Methoden verhalfen dieser Disziplin zum entscheidenden Durchbruch. Die funktionellen Zusammenhänge konnten somit auf naturwissenschaftlicher Basis definiert werden. Die Kommunikation über gemeinsame Signalträger (Zytokine/ Neurotransmitter) und deren Rezeptoren stellt hierbei die Grundlage der physiologischen Vernetzung dar.

## 1.1 Die rheumatoide Arthritis

### 1.1.1 Allgemeines

Unter dem Sammelbegriff *Rheuma* werden zahlreiche Erkrankungen der Stütz- und Bewegungsorgane, insgesamt ca. 400 verschiedene Formen, zusammengefasst<sup>163</sup>. Nach Art und Lokalisation der Erkrankung wird in entzündlich-rheumatische bzw. degenerativ-rheumatische (Arthrosen) Gelenkerkrankungen und rheumatische Weichteilerkrankungen unterschieden. Sind in erst genannter Gruppe der *Arthritiden* mehrere Gelenke betroffen (polyartikulär), spricht man von *rheumatoider Arthritis* (RA). Hierbei handelt es sich um eine chronisch-entzündliche, systemische Erkrankung des Bindegewebes, welche meist die Fingergrund- und Handwurzelgelenke, die Gelenke der Füße sowie Knie und Schultern betrifft. Prinzipiell können aber sämtliche Gelenke des Körpers, ebenso wie in späteren Phasen innere Organe (Lunge, Herz, Augen, Haut), betroffen sein. Der Verlauf der RA kann entweder durch eine stetige Verschlechterung der Symptome oder ein schubweises Auftreten der akuten Entzündung charakterisiert werden. Mit einer Prävalenz von 0,5 bis 1% der Weltbevölkerung und einer Inzidenz von 30 / 100.000 Einwohner ist die RA die häufigste chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung. Sie kann in jedem Alter auftreten, hat ihren Gipfel aber um das 50. Lebensjahr und reduziert die statistische Lebenserwartung um 5 – 10 Jahre<sup>50</sup>. Frauen sind rund dreimal häufiger betroffen als Männer, wobei der Geschlechterunterschied mit

zunehmenden Alter abnimmt<sup>41</sup>. Auch der wirtschaftliche Aspekt der RA ist nicht zu vernachlässigen. So belaufen sich die jährlichen Kosten für Arzneimittel je nach Therapieform auf bis zu 17.000\$ / Patient, wobei die Aufwendungen für Behandlung und Erwerbsunfähigkeit noch nicht berücksichtigt sind<sup>113</sup>. Nach Angaben der Europäischen Union stellen entzündliche Erkrankungen des Bewegungsapparates momentan die Hauptursache für Invalidität und Arbeitsplatzverlust dar<sup>166</sup>.

### **1.1.2 Diagnose und Symptome**

Neben unspezifischen Symptomen wie Appetitlosigkeit, leichter Ermüdbarkeit und allgemeiner Schwäche, tritt als erstes charakteristisches Anzeichen die Morgensteifigkeit der Fingergelenke für etwa 30 Minuten auf. Die zunächst nur bei Bewegung, später aber auch in Ruhe schmerzenden Gelenke sind dabei heiß, gerötet und angeschwollen. Im Krankheitsverlauf kommt es zum Befall weiterer Gelenke und typischen Gelenksverformungen. Ulnadeviation, Schwanenhals- und Knopflochdeformität seien hier beispielhaft genannt (Abb. 1). Ebenso sind extraartikuläre Manifestationen möglich. Betroffen sind vorrangig Lunge (Lungenfibrose, Pleuritis), Herz (Perikarditis), Augen (Skleritis), Haut (Vaskulitis) sowie Speichel- und Tränendrüsen<sup>50</sup>. Auch ein erhöhtes Risiko für Paradontitis, Zahnverlust und kardiovaskuläre Krankheiten wurde bei RA-Patienten nachgewiesen<sup>81,82</sup>. Neben diesen körperlichen Beschwerden wurden zuletzt auch psychische Leiden, wie Depressionen, mit der RA in Beziehung gebracht. Die Mehrheit der Rheumatiker ist dabei betroffen und weist neben einer ausgeprägteren Verlaufsform mit stärkeren Gelenkschmerzen auch geringere Therapieerfolge auf<sup>37,90</sup>.

Die Kriterien zur Diagnose der RA umfassen neben den aufgeführten Symptomen auch die Veränderung bestimmter Blutwerte (Rheumafaktor, C-reaktives Protein) und die typischen Veränderungen der Gelenke im Röntgenbild. Hierzu zählen unter anderem gelenknahe Osteoporose (Kalksalzmangel im Knochen) und Knochenerosionen. Das American College of Rheumatology (ACR) stellte hierfür bereits 1987 eine Liste mit 7 Kriterien zusammen, wobei für eine vereinheitlichte Diagnose davon 4 erfüllt sein und mindestens 6 Wochen Bestand nachweisen müssen<sup>5</sup>.





**Abb.1 Gelenkverformungen der RA**

Ulnadeviation (gelb), Schwanenhals- (blau) und Knopflochdeformität (rot). Mehrere Gelenke sind durch Erosionen zerstört; insgesamt diffuse Entkalkung (fleckig).

[nach: Dr. med. Kay-Geert Hermann, Institut für Radiologie, Klinik für Strahlenheilkunde, Charité Berlin. <http://radiologie.charite.de>]

### 1.1.3 Ätiologie

Nach aktuellem Stand der Forschung ist die initiale Ursache der RA weiterhin nicht genau geklärt. Da der Nachweis eines einzelnen Elementes als Auslöser der Erkrankung bislang ausblieb, geht man bei der Entwicklung der RA von einem Prozess aus, an dem mehrere Faktoren beteiligt sind. Die immunologische Kreuzreaktivität zwischen einem körpereigenen Molekül und einem fremden Antigen, verbunden mit einer genetischen Prädisposition, werden momentan diskutiert. Das Prinzip des ‚molekularen Mimikry‘ könnte hierbei eine zentrale Rolle einnehmen. Bakterielle (Mykoplasmen, Chlamydien) oder virale (Epstein-Barr-Virus, Parvovirus B19, Retroviren, Zytomegalievirus) Krankheitserreger zeigen in ihren Strukturen Homologien zu körpereigenen Aminosäuresequenzen, welche somit ebenfalls vom Immunsystem als Antigen erkannt werden<sup>3,121,139</sup>. Strukturen mit arthritogenem Potenzial können Kollagen Typ II, CH65 (Chondrozytenmembranprotein), HSP65 (Hitzeschockprotein), Proteoglykane oder zyklisch citrullinierte Proteine sein<sup>7,8</sup>. Das vermehrte Auftreten der RA bei Menschen, die bestimmte HLA-Subtypen (humanes Leukozytenantigen) aufweisen, legt die Vermutung einer genetischen Prädisposition nahe<sup>111</sup>. HLA-Gene kodieren Peptide, die den MHC-Komplex (Major Histocompatibility Complex) bilden, welcher Grundlage für die Antigenpräsentation ist. Eine konservierte Sequenz (‚shared epitope‘) in der dritten hypervariablen Region der  $\beta_1$ -Domäne dieser Proteine wird hierbei zugleich von infektiösen Erregern exprimiert und immunologisch kreuzreaktiv erkannt<sup>55</sup>. Ebenfalls werden die Trisomie vom Chromosom 7 in synovialen Fibroblasten, Polymorphismen in Genen wie PTPN22 (Protein Tyrosine Phosphatase N22) oder CTLA4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) sowie SNPs

(Single Nucleotide Polymorphism) bei STAT4 (Signal Transducers and Activators of Transcription 4) und TRAF1-C5 (TNF Receptor-associated Factor 1) als genetische Risikofaktoren für die RA diskutiert<sup>4,147</sup>. Gleichfalls wird Rauchen als exogener Umweltfaktor mit der erhöhten Gefahr an RA zu erkranken in Verbindung gebracht<sup>8</sup>. Stress sowie dessen Prävention beeinflussen ebenso die Wahrscheinlichkeit einer rheumatischen Erkrankung<sup>90,102</sup>.

#### **1.1.4 Pathogenese**

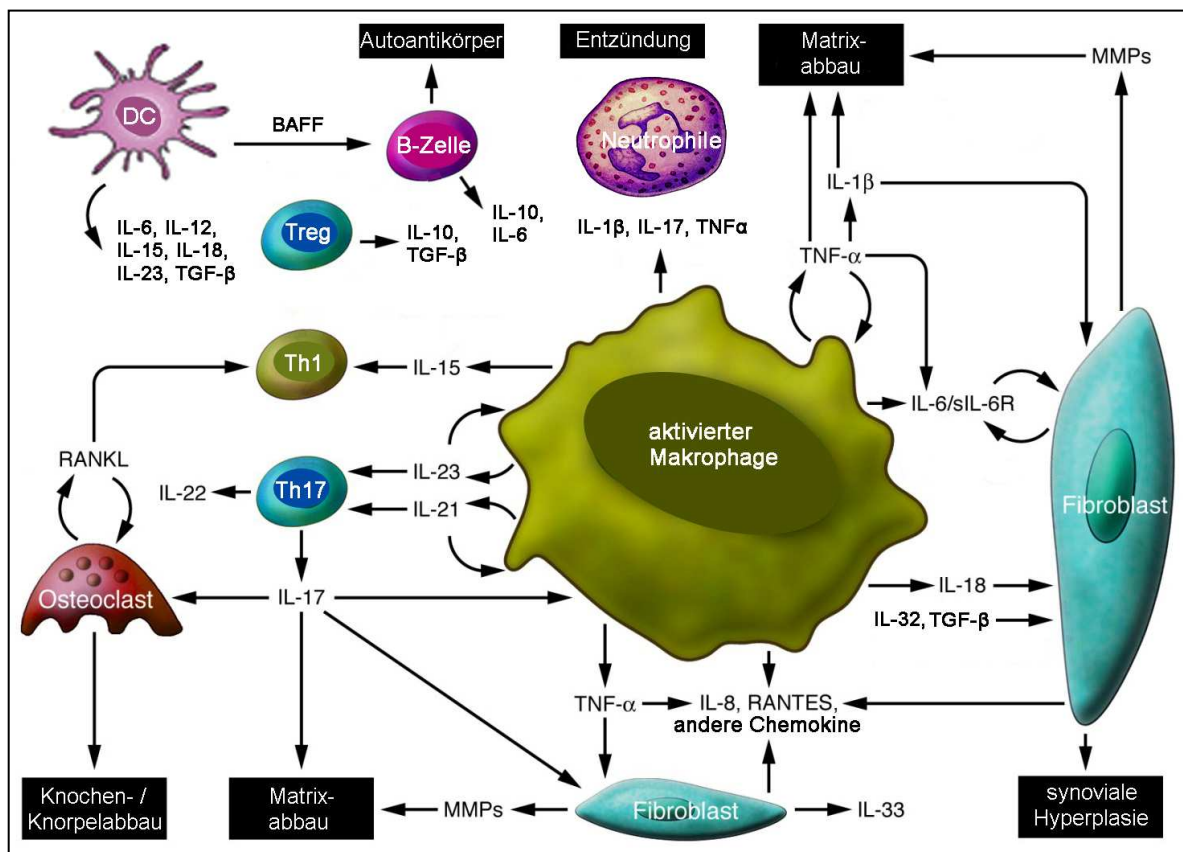
Mit einer Entzündungsreaktion als Antwort auf ein bislang unbekanntes Antigen beginnen die pathologischen Prozesse der RA. Im betroffenen Gelenk kommt es zur Anhäufung von Zellen des Immunsystems, welche sich dort effektiv gegenseitig stimulieren können. Zu diesem zellulären Infiltrat zählen vorrangig neutrophile Granulozyten, Makrophagen (MØ), dendritische Zellen (DC) sowie B- und T-Lymphozyten. Neben der Phagocytose sind die Granulozyten an der Aktivierung und Differenzierung der DC und MØ beteiligt, welche wiederum die MHC-II-gebundene Antigenpräsentation für die T-Helferzellen (Th) ermöglichen. Eine zentrale Rolle in der Pathogenese nimmt die Veränderung der Synovialmembran (SM) ein. Im gesunden Gelenk besteht diese aus einer 1-2 Lagen starken Deckzellschicht (Intima), bestehend aus Fibroblasten- und MØ-ähnlichen Zellen, und einer darunter liegenden Subintima, die als zellarmes Bindegewebe neben synovialen Fibroblasten (SFB) hauptsächlich Blut- und Lymphgefäße aufweist. Über die Bindung an Adhäsionsmolekülen kommt es im Lauf der Entzündungsreaktion (Synovitis) zur Besiedlung der SM von B- und T-Lymphozyten, die zusammen mit DC und MØ über sezernierte Zytokine die SFB aktivieren. Eine unkontrollierte Vermehrung dieser Zellen bis zu einer Dicke von 10 Zellschichten sowie die Entstehung weiterer lymphoider Aggregate und verstärkte Angiogenese in der Subintima resultieren in einer stark vaskularisierten Bindegewebswucherung, dem Pannus. Dessen Vordringen in den Gelenkspalt und Einwachsen unter den Knorpel führt zusammen mit der Abgabe knorpel- und knochenabbauender Enzyme durch die aktivierten SFB zu einer dauerhaften Gewebeschädigung. Vor allem Cystein-, Serin- und Matrixmetalloproteasen sind hierbei zu nennen. Am Knochenabbau bzw. der Demineralisation dessen sind ebenfalls die Osteoklasten beteiligt. Die Differenzierung von Monozyten zu aktivierten Osteoklasten durch RANKL (Receptor Activator of NF-κB Ligand), welcher von SFB und Th-Zellen exprimiert wird, ist dabei Voraussetzung<sup>137</sup>. Im Verlauf der Chronifizierung der RA nimmt der Anteil polymorphnukleärer Zellen (neutrophile Granulozyten) im zellulären Infiltrat des Gelenks wieder ab und es

dominieren Mononukleäre (Makrophagen und Lymphozyten). Eine entscheidend pro-inflammatorische Rolle wird zudem den B-Lymphozyten zugeschrieben<sup>40</sup>. Neben der Funktion zur Antigenpräsentierung, welche die T-Zell-Aktivierung und anschließend die Aktivierung der MØ zur Folge hat, sezernieren sie auch selbst Zytokine (IL-10) und bilden Autoantikörper<sup>103</sup>. Diese gegen körpereigene Immunglobuline oder citrullinierte Proteine gerichteten Antikörper sind nicht nur spezifische Marker der RA (z.B. der Rheumafaktor), sondern tragen auch zur Schwere der Autoimmunreaktion bei, wobei die genauen Mechanismen noch nicht geklärt sind<sup>47,84</sup>.

Ein komplexes Netzwerk von Zytokinen, Chemokinen, Proteinasen und Wachstumsfaktoren, die von unterschiedlichen Entzündungszellen im synovialen Gewebe gebildet werden, bestimmt wesentlich die Pathogenese der RA. Die intrazelluläre Kommunikation zwischen T- und B-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und synovialen Fibroblasten wird durch die Sekretion dieser löslichen, regulatorisch wirkenden Peptide und die Expression der jeweiligen Rezeptoren ermöglicht (Abb. 2)<sup>105</sup>. Dabei tragen vorrangig Interleukine (IL) zu Aktivierungs- und Differenzierungsprozessen bei. Aufgrund ihrer Wirkung können sie grundsätzlich in pro- (z.B. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) und anti-inflammatorische (z.B. IL-4, IL-10, TGF $\beta$ ) Zytokine eingeteilt werden<sup>45</sup>. Dies stellt allerdings kein Dogma dar, da sich je nach Wirkungsort und beteiligten Zellen die einzelne Funktion durch das Zusammenspiel mehrerer Zytokine ergänzen, abschwächen oder umkehren kann. Ein solches vielseitiges Wirkungsspektrum ist auch bei den erst vor kurzen charakterisierten Interleukinen der IL-1- (IL-33), IL-2- (IL-21) und IL-12-Superfamilie (IL-23, IL-27, IL-35) zu erkennen. Vor allem die Differenzierungs- und Regulatormechanismen zu den Subpopulationen der Th-Zellen (Th1, Th2, Th17) werden dadurch gesteuert<sup>49</sup>.

Im Krankheitsgeschehen der RA ging man lange Zeit von dem starren Paradigma aus, dass die pro-inflammatorischen Zytokine der Th1-geprägten Immunantwort (IL-1, IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) über die der Th2-Antwort (IL-4, IL-5, IL-10) dominieren. Generell wurde somit den Th1-Zellen ein pro-inflammatorischer Charakter und den Th2-Zellen eine protektive Wirkung nachgesagt. In der Tat weisen die das Synovium infiltrierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen hauptsächlich den Th1-Phänotyp auf und die Schwere der Gelenkschädigung steht in Zusammenhang mit der initialen T-Zellzahl im Gelenkspalt<sup>80</sup>. Experimentelle Arthritismodelle an Versuchstieren zeigten jedoch, dass das Zusammenspiel der einzelnen Zytokine weitaus komplexer ist. So wurde beispielsweise am Modell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) nachgewiesen, dass Interferon- $\gamma$  nicht essenziell für die Entzündungsreaktion

ist und in der initialen Phase der AIA sogar anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt. Das Fehlen von  $\text{INF}\gamma$  verschlimmert hierbei über eine gesteigerte Menge an produziertem IL-17 die Erkrankung, wodurch der Th17-Subpopulation im Entstehen der Entzündungsreaktion eine fundamentalere Rolle als den Th1-Zellen zugeschrieben wird<sup>66</sup>.



## Abb. 2 Zelluläre Interaktionen in der Pathogenese der RA

Die Kommunikation zwischen den unterschiedlichen Immunzellen im Synovium wird durch ein komplexes Netzwerk an Zytokinen, Chemokinen, Proteinasen und Wachstumsfaktoren ermöglicht. Dabei tragen auto- und parakrine Mechanismen zu Aktivierungs- und Differenzierungsprozessen bei.

Abkürzungen: BAFF, B-cell activating factor; DC, dendritische Zelle; MMP, Matrixmetalloprotease; RANKL, Receptor activator of NF- $\kappa$ B-Ligand; RANTES, 'regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted'.

(modifiziert nach Brennan & McInnes, 2008<sup>24</sup>)

### 1.1.5 Therapie

Nach aktuellem Stand der Forschung gibt es für die RA keine heilende Therapieform oder gar präventive Maßnahmen. Die Hauptziele einer Behandlung sind dementsprechend das dauerhafte Nachlassen der Krankheitssymptome und der Funktionserhalt betroffener Gelenke. Um den operativen Eingriff als letztes Mittel nicht in Betracht ziehen zu müssen, stehen neben der möglichst frühzeitigen Aufnahme physiotherapeutischer Maßnahmen verschiedene medikamentöse Therapieformen zur Wahl, die im Folgenden kurz erläutert werden<sup>138</sup>. Hierbei ist die Kombination aus anti-inflammatorischer Wirkung und strukturerhaltendem Effekt bei modernen Therapeutika ausgewiesenes Ziel<sup>130</sup>.

#### DMARDs

Disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) sind eine heterogene Gruppe von Basistherapeutika, deren anti-inflammatorische Wirkung erst nach frühestens 1 Monat einsetzt und die damit einen zeitigen Therapiebeginn nach Diagnosestellung erfordern. Ebenso werden Kombinationen aus mehreren DMARDs eingesetzt, um den Verlauf der RA bestmöglich kontrollieren zu können. Der Folsäure-Antagonist Methotrexat ist der am häufigsten eingesetzte Vertreter dieser Gruppe. Als Antimetabolit hemmt er in erster Linie die Synthese von Purin und Pyrimidin. Sein zytostatischer Effekt betrifft allerdings auch andere sich schnell teilende Körperzellen, die nicht am Immungeschehen beteiligt sind und birgt damit ein Risiko für Nebenwirkungen. Dieses wird durch Folsäure-Substitution gemindert. Als weitere DMARDs sind Goldpräparate, Sulfasalazin, Hydroxychloroquin und Leflunomid zu nennen. Während Letzteres ebenso die Pyrimidinsynthese hemmt, ist bei dem aktuell nur noch vereinzelt eingesetzten intramuskulären Gold der Wirkungsmechanismus weitestgehend unklar. Sulfasalazin hemmt über den Arachidonsäurestoffwechsel die Cyclooxygenase-1 und -2 (COX-1/-2) bzw. wirkt als Fänger DNA-schädigender reaktiver Radikale. Hydroxychloroquin, welches ebenso zur Malariaphylaxe eingesetzt wird, beeinflusst vermutlich die Antigen-Präsentation über MHC II-Moleküle durch Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes<sup>48</sup>.

#### NSAIDs

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) werden häufig zu Beginn einer Therapie eingesetzt, da sie binnen kurzer Zeit die Symptome der RA lindern können. Über die Hemmung der Enzyme Cyclooxygenase-1 und -2 verhindern sie die Synthese von Prostaglandinen, wodurch ein anti-inflammatorischer und

schmerzstillender Effekt erreicht wird. Da diese Gewebshormone auch in der Magen-Darmschleimhaut vorkommen, sind Entzündungen im gastrointestinalen Bereich als Nebenwirkungen möglich. Die Progression der RA können NSAIDs dauerhaft nicht verhindern. Ältester Vertreter dieser Gruppe ist die aktuell nur noch vereinzelt eingesetzte Acetylsalicylsäure (Aspirin). Des Weiteren sind Ibuprofen und Dicloferac zu nennen. Neben diesen nichtselektiven NSAIDs gibt es auch selektive COX-2-Hemmer, wie z.B. Etoricoxib, dem eine bessere Magen-Darm-Verträglichkeit zugeschrieben wird.

### **Glucocorticoide**

Künstlich hergestellte Glucocorticoide wie z.B. Dexamethason leiten sich von den natürlich vorkommenden Steroidhormonen der Nebennierenrinde ab. Sie besitzen eine stark entzündungshemmende und immunsuppressive Wirkung, die Symptome bei RA-Patienten rasch lindern können. Wegen ihrer auf Dosis und Therapiedauer bezogenen Nebenwirkungen wird der Einsatz dieser Therapeutika aktuell diskutiert<sup>130</sup>. Sie zeichnen sich für die Behandlung akuter Schübe als sehr erfolgreich ab, sind jedoch nicht als Langzeittherapie geeignet.

### **Biologicals**

Die Gruppe der biologischen Immunmodulatoren (Biologicals) sind die neuesten Vertreter antirheumatischer Therapeutika. Das in den letzten Jahren gewachsene Verständnis über die molekularen Pathogenesemechanismen der RA machte es möglich, wichtige Schlüsselzytokine zu identifizieren, deren Blockade oder Regulation das Aktivieren von relevanten Zelltypen verhindert. Spezifische Antikörper, lösliche Rezeptoren oder Rezeptorantagonisten können Zytokine, deren Rezeptoren oder Zelloberflächenmoleküle binden und somit zu einer funktionellen Einschränkung führen. Auch die direkte Verwendung anti-inflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-10) ist möglich, um die Entzündungsreaktion einzudämmen. Im besonderen Fokus stehen dabei TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und das Oberflächenmolekül CD20.

In der Therapie gegen TNF $\alpha$ , welches von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und T-Zellen gebildet wird, kommen Antikörper gegen die membrangebundene (*Infliximab*) und lösliche Form (*Adalimumab*) dieses Zytokins sowie ein mit IgG1 fusioniertes TNF-Rezeptorprotein (*Etanercept*) zum Einsatz. Rekombinante Formen von Rezeptor-Antagonisten (Ra) werden bei den Medikamenten *Anakinra* (IL-1Ra) und *Tocilizumab* (IL-6Ra) zur Blockade der jeweiligen Zytokine verwendet. Gegen das CD20-Protein der B-Zellen gerichtet ist der Antikörper *Rituximab*, der oft in Kombination mit Methotrexat verwendet wird,

wenn TNF $\alpha$ -Therapien nicht ansprechen. Der schnellen und gezielten Wirkung der Biologica stehen allerdings die hohen Kosten und das Fehlen langjähriger Therapieerfahrung als Risiken gegenüber.

### **Angriffspunkte zukünftiger Therapeutika**

In zahlreichen klinischen Studien werden aktuell viele Kandidaten für neue Biologicals getestet. Die Liste der möglichen Angriffspunkte ist dabei sehr lang und umfasst neben weiteren Zytokinen (IL-12, IL-17) und Oberflächenmolekülen (CD80/86) Chemokine (CCR5), Wachstumsfaktoren (BAFF) und Moleküle intrazellulärer Signalkaskaden (JAK1/2, p38, PI3K $\gamma$ )<sup>162</sup>.

## **1.2 Experimentelle Arthritismodelle**

### **1.2.1 Allgemeines**

Experimentelle Tiermodelle der RA bieten zahlreiche Vorteile gegenüber humanem Untersuchungsmaterial, um Ursache, Verlauf und Therapiemöglichkeiten der Autoimmunerkrankung studieren zu können. Gelenke aus RA-Patienten sind nach operativen Eingriffen nur begrenzt verfügbar und repräsentieren eine fortgeschrittene und zumeist therapierte Form der Arthritis. Definierte Versuchsbedingungen, genetische Homogenität und die Möglichkeit über große Individuenzahlen statistische Auswertungen führen zu können, bieten Modelle mit Ratten oder Mäusen. Die pathogenetischen Mechanismen können im Versuchstier studiert werden, und die Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf das Krankheitsgeschehen im Menschen zu. Experimentelle Arthritiden lassen sich durch exogene Erreger oder das Hervorrufen von Autoimmunreaktionen induzieren. Neben der in dieser Arbeit angewandten Antigen-induzierten-Arthritis (AIA) gibt es eine Vielzahl weiterer Modelle, die sich in erster Linie durch das applizierte Antigen unterscheiden. Neben dem ältesten Typ, der Adjuvans-Arthritis (AA), bei dem mit *Mycobacterium tuberculosis* supplementiertes Freund'sches Adjuvans injiziert wird, ist die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) das am häufigsten beschriebene Modell<sup>32, 116</sup>. Hierbei richtet sich die Immunantwort gegen bovines Kollagen Typ II und führt nach 2 – 3 Wochen zu einer spontanen Entzündungsreaktion in mehreren Gelenken. Ebenso sind die Proteoglykan-induzierte Arthritis, bei der gegen den Knorpelbestandteil Proteoglykan immunisiert wird, die gegen Glucose-6-phosphat-Isomerase (GPI) gerichtete GPI-Arthritis sowie die Streptokokken-Zellwand-Arthritis zu nennen<sup>52,132</sup>. Bei der zuletzt genannten Form führt ein adjuvansfreier systemischer Kontakt mit Bestandteilen von *Streptococcus pyogenes* zu einer

Polyarthritis<sup>12</sup>. Bei der KBxN-Arthritis werden in einer Autoimmunreaktion Antikörper gegen GPI gebildet, wodurch sich im Gelenk eine entzündliche Arthritis manifestiert. Der T-Zell-Rezeptor dieser suszeptiblen Tiere, die eine F1-Kreuzung von transgenen KRN-TCR- und NOD-Mäusen sind, ist spezifisch für Glukose-6-Phosphat-Isomerase<sup>79</sup>. Ein weiteres Beispiel für transgene Arthritiden sind hTNFtg-Mäuse, die humanes TNF $\alpha$  exprimieren und spontan eine Arthritis entwickeln<sup>71</sup>.

### 1.2.2 Antigen-induzierte Arthritis

Das Modell der Antigen-induzierten Arthritis wurde 1962 von Dumonde und Glynn in Kaninchen entwickelt und 1977 von Brackertz et al. erstmals in der Maus etabliert<sup>19</sup>. Seidem wurde es ebenso in Meerschweinchen, Ratten und Schafen verwendet. Es handelt sich um ein unilaterales, CD4<sup>+</sup> T-Zell-abhängiges Modell, wie Zelltransfer-Versuche immunkompetenter T-Zellen in immundefiziente Rezipienten bewiesen<sup>20,21</sup>.

In dieser Arbeit wurden 8 – 10 Wochen alte Mäuse vom Stamm C57BL/6 durch zweimalige subkutane Injektion gegen das in komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) emulgierte Antigen mBSA (methylierstes bovines Serum-Albumin) immunisiert. Die gleichzeitige intraperitoneale Gabe von hitzeinaktivierten *Bordetella pertussis*-Keimen verstärkt die Immunogenität des Antigens, wodurch eine Hyperreaktivität und Chronizität erreicht wird<sup>64</sup>. Hierbei spielt die durch *B. pertussis* begünstigte Synthese von IL-23 und die daraus resultierende Verstärkung der Th1-Antwort eine Rolle<sup>44</sup>. Die Entzündungsreaktion wird durch die intraartikuläre Applikation des Antigens ausgelöst und hat eine monoartikuläre Arthritis zur Folge. Hierbei ist der kationische Charakter des mBSA entscheidend, um eine ausreichende Retention an den negativ geladenen Oberflächen des Gelenks zu gewährleisten. Es beginnt daraufhin eine akute Entzündungsreaktion mit Schwellung, Überwärmung, Rötung und Schmerzen. Auf die Bildung von Immunkomplexen sowie die Aktivierung und Freisetzung von C-reaktivem Protein folgt im Gelenk und periartikulären Gewebe die Infiltration von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Lymphozyten. Zudem wird durch synoviale Hyperplasie die Bildung eines Pannus ermöglicht. Mit zunehmender Chronifizierung der Arthritis kommt es durch Nekrosen und sezernierte Proteasen zu vermehrtem Abbau der Knorpel- und Knochensubstanz mit irreversiblen Schäden. Die Charakteristika dieser Entzündung entsprechen dem histologischen Bild der RA. Durch erneute intraartikuläre Applikation des Antigens kann eine Flare-up-Reaktion erzeugt werden, die den akuten Entzündungsschüben im humanen Krankheitsbild ähneln<sup>87</sup>. Die Vorteile dieses experimentellen Modells



liegen neben der hundertprozentigen Inzidenz im exakt bestimmbar Zeitpunkt des Beginns der Entzündung und der Antigendosis-abhängigen Schwere der Erkrankung. Ebenso stellt die Suszeptibilität für viele Mausstämme, welche durch die fehlende MHC-Restriktion gewährleistet wird, einen großen Nutzen dar<sup>21</sup>. Hierdurch können auch transgene und knock-out-Tiere mit einem genetischen C57BL/6-Hintergrund zu Studien herangezogen werden. Die Stämme Balb/c und DBA/1 zeigen vor allem in der akuten Phase ebenso eine Entzündungsreaktion<sup>152</sup>.

### **1.3 Das Nervensystem**

Das Nervensystem der Vertebrata gliedert sich topographisch in das Zentralnervensystem (ZNS) und das periphere Nervensystem (PNS). Während erstgenanntes in Gehirn und Rückenmark unterschieden wird, differenziert man das PNS nach funktionellen Aspekten in das somatische und das vegetative Nervensystem. Für die bewusste Wahrnehmung von Reizen, die der Umwelt oder dem Körperinneren entstammen, und der willkürlichen Steuerung motorischer Funktionen zeichnet sich das somatische PNS verantwortlich. Dabei werden vor allem die Haut, Gelenke und die quergestreifte Muskulatur mit peripheren Nerven innerviert, welche als Spinalnerven über die Hinterwurzeln (Afferenzen) bzw. Vorderwurzeln (Efferenzen) mit dem Rückenmark verbunden sind. Im Gegensatz hierzu kontrolliert das vegetative Nervensystem ohne willentliche Steuerung die Vitalfunktionen innerer Organe zur Aufrechterhaltung der körpereigenen Homöostase. Es wird in Sympathikus, Parasympathikus und enterisches Nervensystem unterteilt, wobei letztgenanntes ausschließlich den Magen-Darm-Trakt innerviert und weniger der Regulation durch das ZNS unterliegt<sup>9</sup>.

#### **1.3.1 Das vegetative Nervensystem**

Lebenswichtige Funktionen wie Herzschlag, Atmung, Blutdruck, Verdauung und Stoffwechsel werden vom vegetativen Nervensystem kontrolliert. Ebenso weisen endo- und exokrine Organe, wie z.B. die Nebenniere, Bauchspeichel- oder Tränendrüsen eine neuronale Versorgung auf.

Aufgrund ihrer Wirkung unterscheidet man das sympathische und das parasympathische System. Der ergotrope (leistungsfördernde) Effekt des Sympathikus und der trophotrope (erholungsfördernde) Charakter des Parasympathikus beschreiben dabei ein antagonistisches Zusammenspiel. Über ein abgestuftes Kontrollsystem balanciert das vegetative Nervensystem somit synaptische Erregungs- und Hemmprozesse. Anatomisch stellt der Sympathikus

eine Kette von Ganglien entlang der Wirbelsäule dar, den sympathischen Grenzstrang, der dem mittleren Drittel des Rückenmarks (Thorakal- und Lumbalmark) entspringt. Kommunikation erfolgt mit den Spinalnerven und den inneren Organen. Die parasympathische Innervation in der Peripherie hat ihren Ursprung zum einen als Vagusnerv im Bereich der Medulla oblongata im Hirnstamm und zum anderen in den Spinalnerven im Bereich der Sakralwirbel.

Der Schaltkreis des vegetativen Nervensystems ist als disynaptische Bahn zu verstehen. Die Zellkörper der vegetativ efferenten Neuronen liegen als autonome Ganglien in der Peripherie, erhalten vom ZNS aus Informationen über präganglionäre Neurone und erreichen über postganglionäre Neurone die Zielorgane. Die Signalübertragung wird mit Neurotransmittern realisiert, wozu ebenso neuroaktive Peptide, Stickstoffmonoxid und ATP zählen. Präganglionär erfolgt die synaptische Übertragung mittels Acetylcholin (ACh), welches an nikotinerge und muskarinerge ACh-Rezeptoren bindet. Somit können schnelle und langsame postsynaptische Aktionspotenziale erzeugt werden, die sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch wirken können. Zudem werden durch Neuropeptid Y und dem vasoaktiv intestinalen Peptid (VIP) regulatorische Effekte erzielt, da deren Freisetzung von der ‚Feuerrate‘ (Anzahl der Aktionspotenziale) präganglionärer Neurone abhängig ist. Im postganglionären Bereich werden unterschiedliche Neurotransmitter verwendet. Während in den parasympathischen Synapsen weiterhin ACh vorkommt, vermittelt der Sympathikus seine Signalübertragung mit Noradrenalin. Dieses erreicht als freigesetzter Botenstoff eine weite Verbreitung und kann über den Blutstrom im Körper verteilt werden. Demgegenüber wirkt ACh nur örtlich sehr begrenzt auf muscarinerge ACh-Rezeptoren.

Strukturell bestehen die Rezeptoren für Noradrenalin (Adrenozeptoren) und der muskarinerge Rezeptor für ACh jeweils aus 7 transmembranalen  $\alpha$ -Helixstrukturen, die intra- und extrazellulär durch 4 Schleifen verbunden sind. Der nikotinerge Acetylcholin-Rezeptor weicht von dieser Struktur ab und setzt sich aus nur 5 membrandurchspannenden Domänen zusammen. Die Adrenozeptoren werden pharmakologisch als  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\beta$  in 3 Familien unterteilt. Die  $\beta$ -Rezeptoren sind noch in die 3 Subtypen  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$  zu untergliedern. In Tabelle 1 sind die jeweiligen molekularbiologischen Wirkungsweisen sowie deren Vorkommen im vegetativen Nervensystem aufgeführt. Durch die Bindung von Noradrenalin wird in der Membran ein G-Protein aktiviert, welches wiederum das Effektorprotein zur Produktion des Second Messenger cAMP aktiviert. Somit können über eine Proteinkinase Kaliumkanäle geschlossen werden, was einen erhöhten Membran-Widerstand zur Folge hat. Aufgrund dessen wird die Zelle erregbarer.

**Tab.1** Adrenozeptoren

Familie	Wirkung auf Effektorprotein	Vorkommen (vegetatives NS)
$\alpha_1$	Aktivierung Phospholipase C	vorwiegend postsynaptisch am peripheren Zielorgan
$\alpha_2$	Hemmung Adenylatzyklase	vorwiegend an präsynaptischen Neuronen
$\beta$	Aktivierung Adenylatzyklase	<ul style="list-style-type: none"> <li>· <math>\beta_1</math>: vorwiegend am Herzmuskel</li> <li>· <math>\beta_2</math>: fast alle Organe; besonders Blutgefäße</li> <li>· <math>\beta_3</math>: vorwiegend im Fettgewebe</li> </ul>

Ebenfalls über das Steuern von Ionenkanälen wirken die cholinergen Rezeptoren. Die postganglionär vorkommenden nikotineren ACh-Rezeptoren stellen dabei selbst einen Ionenkanal dar, der seine Struktur nach Bindung des Transmitters ändert. Der muskarinerge Rezeptor weist einen ähnlichen G-Protein-gekoppelten intrazellulären Signalweg mit Phospholipase C als Effektorprotein wie die Adrenozeptoren auf.

**Tab.2** Pharmaka, die auf das vegetative Nervensystem einwirken

Name	Effekt	Wirkung	Typen
Sympatholytikum	· hemmen sympathischen Effekt	· Blockade adrenerger Rezeptoren	<ul style="list-style-type: none"> <li>· <math>\alpha</math>-Rezeptorblocker</li> <li>· <math>\beta</math>-Rezeptorblocker</li> <li>· Antisymphathonika</li> </ul>
Parasympatholytikum	· hemmen para-sympathischen Effekt	· kompetitive ACh-Hemmung	
Sympathomimetikum	· stimulieren Sympathikus	<ul style="list-style-type: none"> <li>· direkt: Aktivierung der Adrenorezeptoren</li> <li>· indirekt: Erhöhung der Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt</li> </ul>	
Parasympathomimetikum	· stimulieren Para-sympathikus	<ul style="list-style-type: none"> <li>· direkt: Aktivierung von muskarinergen ACh-Rezeptoren</li> <li>· indirekt: hemmen Abbau von ACh</li> </ul>	

Da Neurone außerhalb der Blut-Hirn-Schranke liegen, können sie auf alle pharmakologischen Wirkstoffe reagieren, die in den Blutstrom gelangen. Diese können

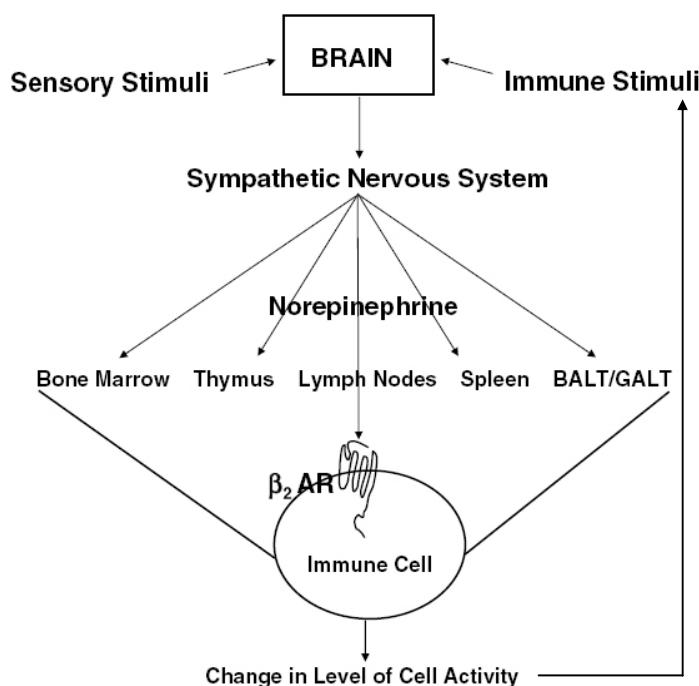
entweder hemmend oder stimulierend auf die beiden Gegenspieler des vegetativen Nervensystems wirken, indem sie an die jeweiligen Transmitter-Rezeptoren binden (Tab. 2). Hierbei können sie die Bindungsstelle blockieren, ohne einen Effekt auszulösen (Antagonisten), oder durch Bindung den Effekt eines Botenstoffs imitieren (Agonisten).

Die Kontrolle des vegetativen Nervensystems erfolgt zentral über den Hypothalamus. Dieser ist Teil des Zwischenhirns und stellt die Schnittstelle zwischen der neuroendokrinen Regulation und dem Gehirn dar. Seine afferenten Einströme erhält er aus dem Körperinneren über verschiedene sensorische Bahnen durch den Thalamus und das limbische System. Signale in die Peripherie können zum einen über Efferenzen vermittelt werden, die seine periventriculäre Zone verlassen und zum Hirnstamm oder den Rückenmarkskernen führen, welche die präganglionären Neuronen des vegetativen Nervensystems enthalten, oder zum anderen durch Aktivierung des hypothalamohypophysären Systems. Hierbei wird vom Hypothalamus CRH (Corticotropin-releasing Hormone) sezerniert, welches in der Adenohypophyse zur Ausschüttung von ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) führt. Dieses wiederum stimuliert die Nebennierenrinde zur Synthese von Glucocorticoiden, die vor allem in Form von Cortisol regulatorisch auf viele physiologische Vorgänge wirken<sup>131</sup>.

Das Wissen über die nervale Versorgung lymphatischer Organe spielt im Bereich der Neuroimmunologie eine wichtige Rolle. Durch retrograden Transport des Pseudorabies Virus (PRV) vom peripheren Zielorgan zum ZNS und mittels chemischen Nachweises der Neurotransmitter konnte der jeweilige Typ der Innervation untersucht werden. Hiermit wurden sympathische Efferenzen bei allen Organen des Immunsystems nachgewiesen (Abb.3). Sowohl die primären lymphatischen Organe Thymus und Knochenmark als auch die sekundären wie Milz und Lymphknoten wiesen zahlreich noradrenerge postganglionäre Neurone auf. Welchen Ursprung diese Nervenbahnen im ZNS haben, ist teilweise noch ungeklärt. Im Fall der Milz entspringen sie beispielsweise den Thorakalwirbeln T1-T12. Eine parasympathische Innervation konnte hingegen in keinem dieser Gewebe gezeigt werden. Als Marker und zur Anfärbung cholinergischer Neurone diente hier Cholinacetyltransferase (ChAT). Ebenso verhält es sich mit afferenten Fasern. Trotz des Nachweises der Neuropeptide Substanz P und Calcitonin gene-related peptide (CGRP), die allgemein mit sensorischen Neuronen assoziiert werden, konnte man keine Signalübertragung in Richtung des ZNS aufzeigen. Lediglich die Lymphknoten von Meerschweinchen zeigten in einem Experiment eine afferente Innervation von den Hinterwurzelganglien ausgehend. Für das Knochenmark fehlen bis dato dahingehende Untersuchungen<sup>109</sup>.

Die Milz stellt im Fall der Neuroimmunologie einen besonderen Knotenpunkt dar. Sie wird entlang der Arterien dicht von sympathischen Fasern innerviert, deren Nervenendigungen anatomisch in Kontakt zu Immunzellen stehen. Neurotransmitter, die postganglionär synthetisiert und in den Endköpfchen gespeichert werden, können nach Freisetzung postsynaptisch über spezifische Adrenozeptoren an Immunzellen binden. Ebenso sind auf der präsynaptischen Membran Zytokinrezeptoren vorhanden, so dass eine bidirektionale Kommunikation stattfinden kann. Es wurde nachgewiesen, dass pro-inflammatorische Zytokine ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ) sowie ACTH die Freisetzung von Noradrenalin modulieren können. Dem gegenüber kann die  $\text{IL-6}$ -Sekretion von Makrophagen über Noradrenalin mittels  $\alpha$ -Adrenozeptoren inhibiert oder in Gegenwart von Cortisol durch  $\beta$ -Adrenozeptoren stimuliert werden<sup>140</sup>.

Die Funktion des Immunsystems kann auch über das ZNS beeinflusst werden. Es ist ein Rückkopplungsmechanismus beschrieben worden, bei dem in der Milz produzierte Zytokine die Stressachse des Hypothalamus stimulieren, was zugleich einen erhöhten Tonus des sympathischen Nervensystems bewirkt. Die Aktivierung von  $\beta$ -Adrenozeptoren unterdrückt somit wiederum die Synthese von  $\text{IL-6}$  und  $\text{TNF}\alpha$  in den Makrophagen (Abb. 3)<sup>140</sup>. Im Fall einer Immunreaktion kann somit ein bestehender Stresszustand das Ansprechen auf ein Antigen abschwächen.



### Abb.3 Sympathische Innervation von lymphatischen Organen über postganglionäre Neurone

Der Neurotransmitter Noradrenalin (Norepinephrine) und die  $\beta_2$ -Adrenozeptoren (AR) auf den Immunzellen übernehmen dabei funktionelle Aufgaben. Über einen Rückkopplungsmechanismus kann das ZNS auch durch immunologische Stimuli beeinflusst werden. BALT/ GALT, Bronchial-/Gut-associated lymphoid tissue. [modifiziert nach Nance & Sanders, 2007<sup>109</sup>]

### 1.3.2 Neuroimmunologie des sympathischen Nervensystems

Alle Regionen des Organismus werden vom sympathischen Nervensystem versorgt, wobei insbesondere Areale, die potenziell Antigenen ausgesetzt sind, eine stark ausgeprägte afferente Innervation aufweisen. Hierzu zählen neben der Haut vor allem das Peritoneum, die Lunge und die Darmschleimhaut. Ebenso erhalten die primären und sekundären lymphatischen Organe eine nervale Innervation und Zellen des Immunsystems exprimieren Rezeptoren für Neurotransmitter (Abb.3). Auf Lymphozyten von Menschen und Nagern wurde hauptsächlich der Adrenozeptor (AR) des Typs  $\beta_2$  nachgewiesen. Dessen Anzahl ist variabel und wird vom Status der Zell-Aktivierung und von Zytokinen, Hormonen und Neurotransmittern reguliert. Nach Stimulierung des  $\beta_2$ -Rezeptors durch Bindung von Noradrenalin oder einen Agonisten wird das Effektorprotein Adenylatzyklase aktiviert und das intrazelluläre Level von cAMP steigt an.

$\beta_2$ -AR-defiziente Mäuse zeigen zwar *in vivo* nach Immunisierung einen normalen Phänotyp, weisen aber bei Untersuchung der Lymphozyten *in vitro* Unterschiede im Bereich der Zytokinsynthese auf<sup>123</sup>. Solche Differenzen sind ebenfalls zwischen den Subpopulationen der T-Helferzellen (Th1 / Th2) beschrieben worden. Während die Noradrenalin-Depletion in adulten Mäusen eine generell verstärkte Zytokin-Produktion nach Immunisierung bewirkt, konnte erst durch die genetische Defizienz von Dopamin- $\beta$ -hydroxylase (DBH) eine geringere Th1-geprägte Antwort auf Pathogene hervorgerufen werden. Das Fehlen dieses für die Noradrenalin-Synthese essenziellen Enzyms verminderte die Entwicklung von naiven T-Lymphozyten in Th1-Zellen und senkte die Menge an sezerniertem Interferon- $\gamma$ . Im Gegenzug erhöhten  $\beta_2$ -selektive Agonisten das Level an Th2-typischem IL-4 und verminderten die Menge an IFN $\gamma$ . Auch in Studien mit humanen PBMC (peripheral blood mononuclear cells) wurde eine solche Verschiebung zum Th2-Zytokin-Millieu beschrieben. Ein direkter Einfluss des Neurotransmitters Noradrenalin auf murine Th2-Zellen wurde bisher nicht nachgewiesen, da diese den  $\beta_2$ -AR nicht exprimieren. Epigenetische Mechanismen werden hierbei als Ursache für die unterschiedliche Differenzierung vermutet<sup>109</sup>.

Ein Zusammenspiel zwischen Immun- und Nervensystem besteht gleichfalls auf Ebene der regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ), welche eine Kontrollfunktion innerhalb der Immunantwort wahrnehmen.  $T_{reg}$  produzieren Tyrosinhydroxylase, ein für die Katecholamin-Biosynthese essenzielles Enzym, und enthalten Noradrenalin. Zusätzlich weisen ~30% dieser Zellen Rezeptoren für Neurotransmitter auf. Wird Noradrenalin von den  $T_{reg}$  abgegeben, führt dies über auto- bzw. parakrine Signalwege zu einer verminderten Produktion von IL-10 und TGF $\beta$  (transforming

growth factor beta). Die vorrangig anti-inflammatorische Funktion dieser T-Zell-Subpopulation wird somit aufgehoben, da die hemmende Wirkung von IL-10 auf pro-inflammatorische Zytokine und die von TGF $\beta$  auf die Proliferation aktivierter Lymphozyten entfällt<sup>31</sup>.

Im Bereich der B-Lymphozyten nimmt das sympathische Nervensystem ebenfalls eine regulatorische Funktion wahr. Ein herabgesetzter Spiegel an Immunglobulin G (IgG) wird sowohl bei Noradrenalin-depletierten Mäusen als auch in Wildtyp-Tieren, die B-Zellen von Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase-defizienten Mäusen transferiert bekamen, beschrieben. Demgegenüber konnte *in vitro* eine erhöhte Produktion an IgG1 und IgE gezeigt werden, wenn die B-Zellen gleichzeitig aktiviert und über den  $\beta_2$ -AR stimuliert werden. Ein kompensierender Mechanismus gleicht diesen Unterschied bei Adrenozeptor-defizienten Mäusen *in vivo* jedoch wieder aus<sup>109</sup>.

Während T- und B-Zellen vorrangig die adaptive Immunabwehr darstellen, wird das angeborene Immunsystem durch Makrophagen, natürliche Killerzellen und neutrophile Granulozyten bestimmt. Auch auf dieser Ebene wirkt das sympathische Nervensystem regulatorisch. Makrophagen, die aus der Milz oder den Lymphknoten isoliert wurden, zeigen hierbei nach Stimulation mit Noradrenalin *in vitro* eine geringere Produktion von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . In Bezug auf IL-6 wurden sowohl inhibitorische als auch stimulierende Effekte beschrieben. Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems mittels entzündlicher Mediatoren im ZNS hat *in vivo* ebenfalls eine anti-inflammatorische Wirkung zur Folge. So setzt der erhöhte Noradrenalin-Spiegel der Milz die Immunantwort auf Lipopolysaccharid als Pathogen herab. Dies wird anhand der verminderten TNF $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Syntheserate gezeigt. Ein Durchtrennen des die Milz innervierenden sympathischen Nervs vor zentralnervöser Aktivierung hebt in diesem Experiment die immunmodulatorische Wirkung auf<sup>109</sup>.

Die Einflussnahme des sympathischen Nervensystems auf Autoimmunkrankheiten rückte in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Forschung. Experimentelle Arthritismodelle an Mäusen oder Ratten stellen dafür geeignete Systeme dar. Sowohl klinisch-symptomatische Parameter als auch Veränderungen auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene werden dabei bewertet. Ein bimodaler Effekt des sympathischen Nervensystems (SNS) wurde am Beispiel der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) gezeigt. Der Zeitpunkt der Sympathektomie erwies sich hierbei als wichtiges Kriterium. Ein milderer Arthritisverlauf sowie eine Verschiebung zu Th2-typischen Zytokinen (IL-4, IL-10) wurde durch eine frühe Sympathektomie vor der Immunisierungsphase erreicht. Denervierte man die Versuchstiere erst im symptomatischen Stadium der CIA, verschlechterte sich der

Krankheitsverlauf und die für Th1-Zellen charakteristischen Zytokine (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) dominierten. Eine pro- und anti-inflammatorische Rolle des SNS steht sich demnach gegenüber<sup>58</sup>.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei Patienten mit rheumatoider Arthritis gefunden. Stimulierte man aus dem Blut isolierte T-Zellen *in vitro* mit Noradrenalin, wurde die Menge an produziertem IL-4 signifikant reduziert. Die gesunde Kontrollgruppe zeigte diesen Effekt nicht. Eine Verschiebung zum anti-inflammatorischen Th2-Zytokinmilieu konnte demnach bei etablierter Erkrankung nicht erreicht werden und der Entzündungsprozess blieb aufrechterhalten<sup>161</sup>.

Wie bereits erwähnt, kann auch die Funktion der regulatorischen T-Zellen durch Noradrenalin beeinflusst werden. Dieser Effekt zeigt sich ebenso im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis. Überträgt man mittels Zelltransfer T<sub>reg</sub> aus immunisierten und sympathektomierten Mäusen in Rezipienten mit persistierender CIA, so verbessern sich die Krankheitssymptome, die Proliferationsrate der T-Lymphozyten sinkt und die Menge an sezerniertem TNF $\alpha$ , IL-17, IL-10 und IL-4 wird reduziert. Gegenüber der Kontrollgruppe verschlechterten sich die Entzündungswerte, wenn die T<sub>reg</sub> vor dem Transfer *in vitro* mit Noradrenalin behandelt werden. Das sympathische Nervensystem scheint demnach die anti-inflammatorischen Eigenschaften der regulatorischen T-Zellen zu unterdrücken<sup>59</sup>.

Am Beispiel der CIA wurde ebenso beschrieben, dass die Interaktion zwischen Immun- und Nervensystem auch bidirektionaler Natur sein kann. Während der Induktionsphase dieses Arthritismodells wurden im Hypothalamus erhöhte Werte von Corticosteron, Adrenalin sowie den Zytokinen IL-1 $\beta$  und IL-6 gemessen. In der symptomatischen Phase der Entzündung war hingegen die noradrenerge Innervation der betroffenen Gelenke vermindert und die ursprüngliche Korrelation der Menge an Noradrenalin und IL-1 $\beta$  im Hypothalamus ging verloren. Die über die HPA-Achse und das sympathische Nervensystem vermittelte neuroimmunologische Kommunikation zwischen ZNS und Peripherie wurde demnach während der Entzündungsreaktion unterbrochen<sup>36</sup>.

### **1.3.3 Nozizeption und Schmerz**

Die International Association for the Study of Pain (IASP) definiert Schmerz als ein *“unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potenzieller Gewebsschädigung verknüpft ist, oder mit Begriffen einer solchen Beschädigung beschrieben wird”*<sup>131</sup>. Eine Chronifizierung erlangt dieser, wenn sein Bestehen 3 bis 6 Monate übertrifft und die Patienten physisch, psychisch und sozial beeinträchtigt. Nach Schätzungen leiden in Deutschland etwa 20 Millionen Menschen unter



chronischen Schmerzen, dabei 80% der RA-Patienten<sup>77</sup>. Die Therapie solcher Zustände ist nach wie vor sehr kompliziert, da die Wirkung herkömmlicher Schmerzmittel mit zunehmender Behandlungsdauer abnimmt und ihre Anwendung durch zahlreiche Nebenwirkungen limitiert wird.

Aktuell wird Schmerz in 4 Kategorien klassifiziert: den nozizeptiven, den neuropathischen, den neuroplastischen und den idiopathischen Schmerz mit unbekannter Ursache<sup>73</sup>. Im Fall der RA wird die komplexe Sinneswahrnehmung *Schmerz* durch Aktivierung des nozizeptiven Systems ausgelöst und folgt auf Noxen (mechanisch, thermisch, chemisch), die den Organismus schädigen können. Im Fall von Entzündungen spricht man vom Nozizeptorschmerz bei pathophysiologischen Prozessen. Durch Sensibilisierung der Nozizeptoren kann eine chronische Schmerzempfindung ausgelöst werden.

Unter Nozizeption versteht man alle physiologischen Prozesse, welche die Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung potenziell gewebeschädigender Reize realisieren. Die freien und verzweigten Nervenendigungen von nichtmyelinisierten C-Fasern und myelinisierten A-Fasern werden Nozizeptoren genannt und innervieren fast alle Gewebe. Sie sind meist polymodaler Natur und reagieren auf verschiedenartige Stimuli durch Änderung ihrer Ionenleitfähigkeit. Mit zunehmender Intensität des Reizes steigt hierbei die Frequenz der erzeugten Aktionspotenziale. Über Afferenzen werden diese Informationen zu Rückenmarksneuronen weitergeleitet. Die synaptische Übertragung der Erregung wird chemisch durch Neurotransmitter vermittelt. Verschiedene aufsteigende Bahnen leiten das noxische Signal zum bis zum Thalamus im Gehirn weiter. Die Verarbeitung der Schmerzempfindung findet letztendlich in Teilen der Großhirnrinde statt.

Im gesunden Organismus sprechen Nozizeptoren nur auf starke Reize an und besitzen demnach eine hohe Erregungsschwelle. In geschädigtem Gewebe wird diese Schwelle für die Schmerzempfindung herabgesetzt, stumme Nozizeptoren werden erregbar und eine verstärkte Antwort auf gleich bleibende Noxen ist die Folge. Diese periphere Sensibilisierung ist lokal begrenzt und Grundlage für eine krankheitsbedingte erhöhte Empfindlichkeit (Hyperalgesie)<sup>9</sup>.

#### **1.3.4 Arthrogener Schmerz**

Gelenke werden sowohl von afferenten Fasern der Klassen A $\beta$ , A $\delta$  und C als auch von efferenten sympathischen Fasern innerviert<sup>62,85</sup>. Die verschiedenen Typen an Nervenbahnen unterscheiden sich dabei im Myelinisierungsgrad und der Leitungsgeschwindigkeit. A $\beta$ -Afferenzen sind niederschwellig mechanosensitiv, d.h. reagieren spezifisch auf Reize geringer Intensität, die keine Schmerzen auslösen

können und vorrangig der Wahrnehmung von Körperbewegungen dienen. Die Nervenendigungen von A $\delta$ - und C-Fasern, die in Bändern, Menisci, der Knochenhaut oder der Kapsel enden, sind dagegen durch potenziell gewebsschädigende starke Reize erregbar und reagieren so mit ihrem hochschwellig mechanosensitiven Charakter auf intensiven Druck und Überdehnung des Gelenkes<sup>106</sup>. Hierzu werden auch die mechanoinsensitiven stummen Nozizeptoren gezählt, welche erst bei entzündlichen Gewebsschädigungen aktiviert werden können<sup>127</sup>. Ursache hierfür ist eine periphere Sensibilisierung, die über verschiedene Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Bradykinin) vermittelt wird und somit den Zustrom afferenter Signale in das Zentralnervensystem verstärkt<sup>126,131</sup>. Eine erhöhte Schmerzempfindung am Ort der Läsion (primäre Hyperalgesie) und im angrenzenden gesunden Gewebe (sekundäre Hyperalgesie) ist die Folge<sup>56</sup>. Aktivierte Nozizeptoren geben zudem Neuropeptide (Substanz P, CGRP - Calcitonin gene-related peptide, VIP - vasoactive intestinal peptide) in ihre Umgebung ab, die direkt auf Blutgefäße in der Gelenkregion wirken. Dieser als *neurogene Entzündung* bezeichnete Effekt verursacht über Vasodilatation und Erhöhung der Gefäßpermeabilität die klassischen Entzündungszeichen (Röte, Hitze, Schwellung). Eine entzündungsbedingte Änderung der nervalen Innervation im Gelenk wurde am Beispiel der Synovialmembran in RA-Patienten gezeigt. Im Gegensatz zu gesundem Synovialgewebe findet man im rheumatisch veränderten Gewebe keine sensorischen oder sympathischen Nervenfasern in der oberen Schicht. Ebenso wurde eine schwächere Färbung für Neuropeptide gezeigt<sup>101</sup>.

Dass die Intensität des Schmerzes nicht zwangsläufig mit dem Grad der Entzündung bzw. Gelenkschädigung korreliert, zeigten Untersuchungen am Beispiel des systemischen Lupus erythematoses und der Osteoarthritis. So wurde mit einer Variante des *COMT*-Gens (Catechol-O-Methyltransferase) ein Marker identifiziert, bei dem RA-Patienten ein 3-fach höheres Risiko für Schmerzen aufweisen<sup>47</sup>. Ebenso wird das Gen *GCH1* (GTP-cyclohydrolase 1) mit dem Schmerzempfinden assoziiert. Sie stellen somit eine Erweiterung im klassischen Bild der schmerzbestimmenden Faktoren dar<sup>28</sup>.

Zudem wurden in verschiedenen experimentellen Entzündungsmodellen Zytokine identifiziert, die sowohl in der Pathogenese der RA als auch in der Schmerzvermittlung eine Rolle spielen. Hierzu zählen in erster Linie TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und IL-18<sup>70</sup>. In der Antigen-induzierten Arthritis der Ratte konnte mittels TNF $\alpha$ -Neutralisation die Schmerzreaktion vermindert werden, obwohl die charakteristischen Entzündungszeichen (Gelenkschwellung, histologische Bewertung) unverändert blieben<sup>16</sup>. Eine reduzierte Makrophagen-Infiltration in die

lumbalen Hinterwurzelganglien, zusammen mit einer abgeschwächten Expression des für die Adhäsion von Immunzellen essenziellen VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), werden hierfür verantwortlich gemacht<sup>134</sup>. Mausstämme, die eine Defizienz für IL-18, IFN $\gamma$  oder den TNF-Rezeptor1 aufweisen, zeigten in anderen Untersuchungen ein ebenso verringertes Schmerzverhalten. Die Rezeptoren des vasoaktiven Endothelins werden dabei als möglicher Vermittler in der Signalkaskade diskutiert<sup>157</sup>. Neben diesen entzündungsfördernden Mediatoren sind auch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 an der Regulation der Nozizeption beteiligt. Verschiedene Studien beweisen, dass sie die von den zuvor genannten Zytokinen (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-18) hervorgerufene Schmerzüberempfindlichkeit mildern können<sup>159</sup>.

Die geläufigsten Strategien zur Schmerztherapie bei RA-Patienten umfassen neben pharmakologischen Mitteln auch die Akupunktur und die Reizstromtherapie TENS (Transkutane Elektrische Nervenstimulation)<sup>73</sup>. Medikamentös wird hierbei auf NSAIDs, Biologicals und die Inhibition der Noradrenalin- und Serotonin-Wiederaufnahme durch Antidepressiva gesetzt. Als Ausblick erscheint eine Möglichkeit zur Schmerzlinderung in der Peripherie ebenso attraktiv, da geringere Dosen an Wirkstoffen und ein geringeres Risiko an systemischen Nebenwirkungen zu erwarten sind<sup>104</sup>.

## **1.4 Ziel der Arbeit**

Die Rolle des sympathischen Nervensystems bei Autoimmunkrankheiten wurde bereits an verschiedenen Tiermodellen der rheumatoiden Arthritis untersucht. Die Ergebnisse der Studien bei der Kollagen-induzierten Arthritis sowie der Adjuvans-Arthritis weisen dem SNS dabei pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften nach. Aufgrund der Verschiedenheit der einzelnen Modelle lässt sich somit keine generalisierte Aussage über die Bedeutung des SNS im Pathogeneseprozess der RA treffen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Einflussnahme des sympathischen Nervensystems im murinen Modell der Antigen-induzierten Arthritis zu beschreiben. Sowohl die Entzündungsparameter als auch das nozizeptive Verhalten und die Veränderungen auf zellulärer Ebene sollten hierfür analysiert werden.

Der Einfluss des Sympathikus auf die Schwere der AIA wurde in der akuten und chronischen Entzündungsphase sowie in der Flare-up-Reaktion untersucht. Dafür wurden klinische als auch immunologische Parameter bestimmt. Ebenso wurde der Einfluss von Agonisten und Antagonisten der Adrenozeptoren auf den Verlauf der AIA sowie die Aktivität von Lymphozyten und Makrophagen bewertet. Zudem wurde

die mechanische und thermische Hyperalgesie bei sympathektomierten Tieren bestimmt, um Veränderungen in der Schmerzwahrnehmung beschreiben zu können.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Trägt die chemische Sympathektomie mit 6-Hydroxydopamin nachweislich zur peripheren Denervation der Versuchstiere bei?
2. Nach welchem Applikationsschema wird durch die Sympathektomie die effektivste Wirkung zur Modulation des AIA-Verlaufs erzielt?
3. Welche klinischen und immunologischen Parameter der AIA werden vom sympathischen Nervensystem beeinflusst?
4. Sind Unterschiede in der Rolle des Sympathikus zwischen der akuten und chronischen Entzündungsphase sowie der Flare-up-Reaktion erkennbar?
5. Welche Rolle spielen Adrenozeptoren bei der neuroimmunologischen Kommunikation im Fall der AIA?
6. Sind bei der AIA Veränderungen im nozizeptiven Verhalten durch die Sympathektomie festzustellen?

Aus den Untersuchungen werden neue Erkenntnisse über die Funktion des SNS bei der akuten und chronischen Entzündung und mögliche neue Therapieansätze erwartet.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Mäusstämme

Für die tierexperimentellen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse vom Stamm C57BL/6 mit dem genetischen Hintergrund H-2<sup>b</sup> (Wildtyp) und IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> (inaktiviertes Gen für IFN $\gamma$ ) verwendet<sup>35</sup>. Die Tiere wurden am Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena gezüchtet oder kommerziell von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen. Die Haltung der Tiere während der Experimente erfolgte in der Einrichtung für Tierhaltung am Institut für Pathologie unter standardisierten Bedingungen (24 °C, 12-stündiger Hell-/Dunkel-Rhythmus, Altromin-Standard-Pellets für Nager, Wasser *ad libitum*). Die Tierversuche und das Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen waren durch das Thüringer Landesverwaltungsamt genehmigt.

#### 2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
Absorptionsmessgerät Sunrise™	Tecan, Crailsheim
Analysewaage basic	Sartorius, Göttingen
Brutschrank Cellstar	Nunc, Wiesbaden
Dynamic Plantar Aesthesiometer	Ugo Basile, Comerio, Italien
Einkanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Elektrophorese-Einheit	Biorad, München
Geldokumentationsanlage FluorChem FC2	Biozym, Hessisch Oldendorf
Inverses Mikroskop Telaval 3	Carl Zeiss Jena, Jena
Kryostat HM 500 M	Microm, Walldorf
Kühlzentrifuge CR 312	Jouan, Unterhaching
Laminar Flow-Box	Elektromat, Dresden
Magnetrührer rct basic	IKA Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipette Research plus	Eppendorf, Hamburg
Mikroplatten-Washer Columbus Pro	Tecan, Crailsheim
Mikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss Jena, Jena
Mikroskop Jenamed	Carl Zeiss Jena, Jena
Mikrotiterplattenwaschgerät Columbus Pro™	Tecan, Crailsheim
Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik, Bad Blankenburg
pH-Meter	Hanna Instruments, Karlsruhe
Photometer UV 1202	Shimadzu, Duisburg
Plantar Test (Hargreaves' Method)	Ugo Basile, Comerio, Italien
Präparationsbesteck	Aeskulap, Tuttlingen
Präzisionswaage BL150	Sartorius, Göttingen
Schnelltaster Oditest	Kroeplin, Schlüchtern
Spannungsgerät Desatron 500/500	Desaga, Heidelberg

Szintillationszähler TopCount	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Tank blotting system	Biorad, München
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 30F	Hettich, Tuttlingen
Vortexgerät VFZ	IKA-Labortechnik, Crailsheim
Wasserbad Thermostat	Julabo, Seelbach
Zellharvester Unifilter-96	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim

**Verbrauchsmaterialien****Hersteller**

PVDF-Blotmembran	Amersham, Freiburg
Einmalfilter (0,2 und 0,45 µm)	Schleicher & Schüll, Dassel
Einmalkanülen (diverse Größen/Längen)	Braun, Melsungen
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspitzen (10, 100 und 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Einmalspritzen (5 und 10 ml)	Braun, Melsungen
Einmalstangenpipetten (2 bis 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
ELISA-Mikrotiterplatten, hochbindend	Greiner, Frickenhausen
ELISA-Mikrotiterplatten, Maxisorb	Nunc, Wiesbaden
FACS-Röhrchen BD	Falcon, Gräfeling-Locharn
Gewebekulturplatten (6-, 24- und 96-Well)	Greiner, Frickenhausen
Objektträger und Deckgläschen	Menzel, Braunschweig
Petrischalen (100/20 mm)	Greiner, Frickenhausen
Polystyrolröhrchen 14 ml	Greiner, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Reagiergefäße (0,5 und 1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman-Filter 3mm	Whatman, Dassel
Zellsieb BD	Falcon, Gräfeling-Locharn

**2.1.3 Reagenzien, Puffer, Kulturmedien****Reagenzien****Hersteller**

Acrylamid	Merck, Darmstadt
AlCl <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat	Alfa Aesar, Karlsruhe
Ascorbinsäure	Laborchemie Apolda
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, Steinheim
CH <sub>3</sub> COOH	Merck, Darmstadt
CH <sub>3</sub> OH	Sigma-Aldrich, Steinheim
CH <sub>4</sub> O	Roth, Karlsruhe
Coomassie Blau	Serva, Heidelberg
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ether	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HCl	Roth, Karlsruhe

HCOOH	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heparin (Liquemin N20000)	Roche, Grenzach-Wyhlen
HEPES-Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Roth, Karlsruhe
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 %)	Laborchemie Apolda
[ <sup>3</sup> H]-Thymidin	Amersham-Buchler, Braunschweig
Komplettes Freund'sches Adjuvans	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lipopolysaccharid (LPS) von <i>E.coli</i> O26:B6	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Mercapto-Ethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Methyliertes Bovines Serum-Albumin	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaCl, 0,9%	B. Braun, Melsungen
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaNO <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
NaOH	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
NH <sub>4</sub> Cl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ortho-Phenylendiamin (OPD)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Para-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin/Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Physiologische Kochsalzlösung	Braun, Melsungen
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
Streptavidin-Peroxidase	Dianova, Hamburg
Szintillationscocktail Microscint O	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
TEMED	Merck, Darmstadt
TRIS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim

### **Puffer**

#### **ELISA:**

*Natriumcarbonatpuffer*, pH 9,5

0,84 g NaHCO<sub>3</sub> je 100 ml Aqua dest.

*Natriumphosphatpuffer*, pH 6,5

1,48 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O + 1,85 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O je 100 ml Aqua dest.

*Natriumphosphatpuffer*, pH 9,0

1,38 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O je 100 ml Aqua dest.

*Stopplösung für alkalische Phosphatase*

5,3 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> je 100 ml Aqua dest.

*Stopplösung für Peroxidase*

2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

*Substratlösung für alkalische Phosphatase*

3,13 mg/ml pNPP in Substratpuffer

*Substratlösung für Peroxidase*

2 mg/ml OPD in Zitratpuffer mit 20 µl/ml 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*Substratpuffer*

0,2 mg/ml MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O in 1:1 TRIS Stammlösung und Aqua dest.

*Zitratpuffer, pH 4,8*

2,1 g Zitronensäure + 16,2 ml 1 N NaOH je 84 ml Aqua dest.

*Waschpuffer*

0,05 % Tween 20 in PBS

Bradford / Gelelektrophorese / Western Blot:

*Blotpuffer*

0,25 M Tris/Base + 1,92 M Glycin + 10% Methanol

*Bradford-Stammlösung*

100 ml Ethanol (95%) + 200 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%) + 350 mg Serva Blue G250

*Bradford-Arbeitslösung*

15 ml Ethanol (95%) + 30 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%) + 30 ml Bradford-Stammlösung + 425 ml Aqua dest.

*Elektrophorese-Laufpuffer, pH 8,3*

25 mM TRIS-HCl + 0,1% SDS + 192 mM Glycin

*Probenpuffer, pH 6,8*

1,5 M TRIS-HCl + 10% Glycerol + 2 % SDS + 5% Bromphenolblau + 5% β-Mercaptoethanol

*TBS (Tris-buffered Saline), pH 7,5*

10 mM Tris + 150 mM NaCl

Sonstige:

*Ammoniumchlorid/TRIS, pH 7,2*

a) 0,83% NH<sub>4</sub>Cl (7,47 g je 900 ml H<sub>2</sub>O)

b) TRIS (2,059 g je 100 ml H<sub>2</sub>O), pH 7,65

a) und b) im Verhältnis 9:1 mischen

*Griess-Reagens*

2,5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 1% Sulfanilamid +

0,1 % N-(1-Naphtyl)-Ethylendiamindihydrochlorid, in Aqua dest.

*Inkubationspuffer, pH 7,8*

100 mM TRIS-HCl + 30 mM CaCl<sub>2</sub> + 0,02% NaN<sub>3</sub> in Aqua dest.

*Lysepuffer*

20mM TrisHCl pH 7,5 + 140mM NaCl + 5mM EDTA + 5% Glycerol (v/v) + SDS 0,1%(v/v) + Triton X-100 1% (v/v)

frisch supplementiert mit Leupeptin 20 µl/ml + Pepstatin 3,4 µl/ml

*PBS (Phosphate-buffered Saline), pH 7,4*

8 g NaCl + 1,44 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O + 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,2 g KCl je 1000ml Aqua dest.



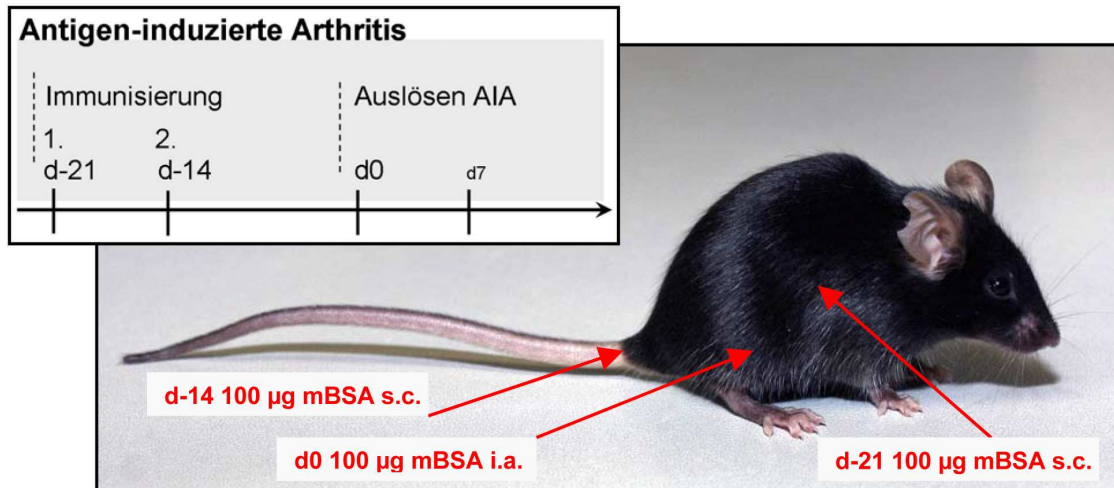
<b><u>Kulturmedium</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
<i>RPMI 1640</i>	Gibco, Karlsruhe
supplementiert mit:	
10% FCS	0,1 µg/ml Streptomycin
10 mM HEPES	2 mM L-Glutamin
1 mM Na-Pyruvat	0,05 mM 2-Mercapto-Ethanol
100 U/ml Penicillin	
<i>SFM</i> (serumfreies Makrophagenmedium)	Gibco, Karlsruhe

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Modell der Antigen-induzierten Arthritis

Als Versuchstiere wurden bei der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) 6-8 Wochen alte weibliche C57BL/6-Mäuse verwendet. 21 und 14 Tage vor dem Auslösen erfolgte eine zweimalige Immunisierung gegen methyliertes bovines Serum-Albumin (mBSA) als Antigen. Dafür wurden 100 µg mBSA in 50 µl physiologischer Kochsalzlösung gelöst und in 50 µl komplettes Freund'sches Adjuvans, supplementiert mit hitzeinaktivierten *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA, Becton Dickinson, Heidelberg) auf eine Endkonzentration von 2 mg/ml, emulgiert. Diese Wasser-in-Öl-Emulsion wurde der Maus subkutan (s.c.) in die rechte Flanke (1. Immunisierung) oder an der Schwanzwurzel (2. Immunisierung) injiziert. Zur Verstärkung der Immunisierung wurden jeweils  $5 \times 10^8$  hitzeinaktivierte *Bordetella pertussis*-Keime (Chiron-Behring, Marburg) als Adjuvans intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Am Tag 0 erfolgte daraufhin das Auslösen der Arthritis am rechten Kniegelenk durch die intraartikuläre (i.a.) Gabe von 100 µg mBSA, gelöst in 25 µl Saline (Abb. 4). Das kontralaterale linke Kniegelenk dient zur späteren Dokumentation der Gelenkschwellung als Kontrolle und verbleibt daher unbehandelt. Ein erneuter akuter Entzündungsschub (Flare-up) kann durch die wiederholte intraartikuläre Applikation von 100 µg mBSA in 25 µl Saline, 3 Wochen nach dem Tag 0, am ipsilateralen Knie hervorgerufen werden.

Für die Gewinnung von Serum und die Entnahme von Organen und Kniegelenken wurden die Tiere mit Ether narkotisiert und mittels Durchtrennen der *Arteria carotis communis* mit anschließender cervikaler Dislokation getötet.



**Abb. 4** Immunisierungsschema der Antigen-induzierten Arthritis

### 2.2.2 Klinische Bewertung der AIA

Nach Induktion der Arthritis kam es zu einer deutlichen entzündlichen Schwellung des rechten Kniegelenkes, welche mittels Schnelltester zu definierten Zeitpunkten an betäubten Tieren gemessen wurde (bis Tag 28), um den klinischen Verlauf zu dokumentieren. Als Referenz wurde zu den jeweiligen Zeiten das kontralaterale, gesunde Gelenk mitgemessen und die Differenz zwischen rechtem und linkem Kniegelenk zur Beurteilung der Schwellung herangezogen.

Für die histologische Untersuchung wurden die Kniegelenke nach Entnahme *in toto* für 24 h in 4,5% Formalin bei Raumtemperatur fixiert. Vor der Einbettung in Paraffin mussten sie zunächst in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder  $\text{AlCl}_3$  entkalkt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Xylol überführt werden. Zur Darstellung der basophilen Zellkerne und des azidophilen Zytoplasmas wurden frontale Schnitte (3 µm) der Gelenke mit Hämatoxylin (blau) und Eosin (rot) gefärbt (HE-Färbung). Pathologen, denen die Zugehörigkeit der jeweiligen Versuchsgruppen nicht bekannt war, beurteilten die Schwere der Arthritis anhand einer von 0-4 reichenden Bewertungsskala. Die Parameter für akute und chronische Entzündung im synovialen und periartikulären Gewebe sowie für Knorpel- und Knochendestruktion wurden dabei berücksichtigt (Tab. 3).

Für die grafische Darstellung des Arthritis-Score wurden als akute Entzündung die Bewertungen für Exsudat und granulozytäre Infiltration zusammengefasst und als chronische Entzündung die Werte für synoviale Hyperplasie, Fibrose und mononukleäre Zellinfiltration summiert. Zudem wurden jeweils die vergebenen Punkte für das Kniegelenk und das periartikuläre Gewebe, ebenso wie die für die Destruktion des Knorpels und des Knochens zusammengezählt. Die Summe aller Parameter stellt der Gesamt-Arthritis-Score dar.

**Tab. 3 Histologisches Bewertungsschema**

Punktesystem für die lichtmikroskopische Beurteilung der Schwere der Arthritis in Kniegelenkschnitten anhand der Parameter für akute und chronische Entzündung sowie Knorpel- und Knochendestruktion.

**Akute Entzündung***Exsudat*

- 1 einzelne Granulozyten
- 2 fleckförmiges Granulozytenexsudat
- 3 massiv

*Granulozytäre Infiltration der Synovialmembran*

- 1 einzelne Granulozyten
- 2 kleinherdig oder diffus mäßig
- 3 mittelgradig bis dicht

+1 wenn Fibrin deutlich nachweisbar

+1 wenn periartikuläres Gewebe mit betroffen

**Chronische Entzündung***Synoviale Hyperplasie (= Hyperplasie der Deckzellschicht)*

- 1 geringe Hyperplasie, keine Aktivierung der lining cells oder keine Hyperplasie, Aktivierung von > 50% der Deckzellen
- 2 > fleckförmige Hyperplasie, mit Aktivierung der Deckzellen
- 3 deutliche Hyperplasie

*Mononukleäre Infiltration der Synovialmembran*

- 1 überwiegend schütter
- 2 überwiegend mäßig
- 3 überwiegend dicht

*Periartikuläre Strukturen (Fibrose, Infiltration)*

- 1 geringe Fibrose/Infiltrat
- 2 mässige Fibrose/Infiltrat
- 3 stark fibrös verbreitert/dichte entzündliche Infiltration

**Destruktion Knorpel/Knochen**

- 1 minimale Gewebsdefekt oder eine Gruppennekrose von Chondrozyten
- 2 >1 kleiner Defekt oder flächenhafte Chondrozytennekrosen oder multiple Gruppennekrosen
- 3 größere Defekte (>10%) einer Gelenkfläche
- 4 massiver Defekt (>50%) einer Gelenkfläche oder mehrere große Defekte

### 2.2.3 Applikation von Wirkstoffen

Für die chemische Sympathektomie wurde 6-Hydroxydopamin hydrochlorid (6-OHDA, Sigma-Aldrich, Steinheim) verwendet. Dieses Neurotoxin wird über dopaminerge und noradrenerge Wiederaufnahme-Transporter in die Neuronen aufgenommen und tötet diese selektiv. Für den *in vivo*-Gebrauch wurde es unter sterilen Bedingungen mit der jeweiligen Konzentration (wenn nicht anderes angegeben 150 mg/kg Körpergewicht) in steriler NaCl-Lösung (0,9%), supplementiert mit 5% Ascorbinsäure-Lösung (0,1 mM), gelöst. Die Applikation erfolgte, soweit nicht anders angegeben, an den Tagen d-1, d0 und d1 im AIA-Verlauf, jeweils in einem Volumen von 100 µl intraperitoneal (i.p.).

Bei der neonatalen Sympathektomie wurde den Versuchstieren täglich an 5 aufeinander folgenden Tagen, beginnend < 24h nach der Geburt, 150 mg 6-OHDA/kg i.p. verabreicht.

Die verwendeten und auf die jeweiligen Subtypen der Adrenozeptoren spezifisch wirkenden Substanzen (alle Sigma-Aldrich, Steinheim) sind in Tabelle 4 aufgeführt. Für die Applikation *in vivo* wurden diese in den jeweiligen Konzentrationen, entsprechend der zuvor beschriebenen Methode für 6-OHDA, gelöst und injiziert. Für die *in vitro*-Untersuchungen der Zellkultur wurden sowohl 6-OHDA als auch die Antagonisten und Agonisten in den jeweiligen Konzentrationen in PBS gelöst und steril filtriert.

#### Tab. 4 Adrenozeptor-Antagonisten und –Agonisten

Die für *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen verwendeten Antagonisten bzw. Agonisten und ihre Spezifität auf die Subtypen der Adrenozeptoren. n.s. - nicht spezifisch.

Name	Wirkung	Spezifität	Konzentration <i>in vivo</i> mg / kg
<b>Propranolol</b>	Antagonist	n.s. beta	10 (Flare-up 20)
<b>Atenolol</b>	Antagonist	beta-1	50
<b>Butoxamine</b>	Antagonist	beta-2	50
<b>Phentolamine</b>	Antagonist	n.s. alpha	10
<b>Isoproterenol</b>	Agonist	n.s. beta	10
<b>Phenylephrine</b>	Agonist	alpha-1	-

### 2.2.4 Bestimmung des Noradrenalingehalts im Milzgewebe

Die Milzen wurden den getöteten Tieren steril zu verschiedenen Zeitpunkten (d1 – d35) entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei -70°C gelagert. Zur Bestimmung des

Noradrenalingehalten wurden die Milzen halbiert, gewogen und mit 400 µl kaltem Lysepuffer in einer Petrischale durch ein Zellsieb homogenisiert. Der Lysepuffer wurde zuvor frisch mit den Protease-Inhibitoren Leupeptin (0,2 µg/ml) und Pepstatin (6,8 ng/ml) supplementiert. Nach dem Überführen in ein 1,5 ml-Reagiergefäß wurde je Probe 1 ml kalter Lysepuffer und 30 µl SDS-Lösung (5%) hinzugegeben und dieser Ansatz unter gelegentlichem Schütteln für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 14.000 U/min und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert. Die Bestimmung des Noradrenalingehaltes in den Proben erfolgte von Dr. Klaus Bellstedt am Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik (Universitätsklinikum Jena). Hierfür wurde ein Kit zur Bestimmung von Katecholaminen (Kat.-Nr. 195-6078, Bio-Rad, München) sowie ein HPLC-System (High Performance Liquid Chromatography) (Bio-Rad, München) verwendet. Die ermittelte Konzentration an Noradrenalin wurde einheitlich auf einen Bezugswert von 100 mg Ausgangsmaterial umgerechnet.

#### **2.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford)**

Um den Proteingehalt einer Probe zu bestimmen, wurde zunächst eine Eichgerade mit definierten Verdünnungen einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml) erstellt. Hierfür wurden 900 µl Bradford-Arbeitslösung auf 100 µl BSA-Lösung gegeben und nach 15 min Inkubation die Extinktion (595 nm) am Photometer gemessen. Als Blindwert wurden 100 µl PBS verwendet. Aus dem Anstieg der Eichgerade ließ sich somit der Proteingehalt der untersuchten Proben errechnen. Diese Konzentration wurde für die Gelelektrophorese auf 1 µg/µl in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingestellt.

#### **2.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Analyse von Proteingemischen und Zelllysaten wurden diese auf einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel nach Größe aufgetrennt. Die Acrylamid-Konzentration betrug im Trenngel 12,5% und im Sammelgel 4% (Tab. 5). Nach dem Gießen und Auspolymerisieren des Gels konnten die Proben und der Proteinmarker (10 µl) aufgetragen werden. Hierfür mussten diese zunächst mit 25 µl Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C aufgeköcht werden, ehe sie in einem Volumen von 75 µl in die Slots laufen gelassen wurden. Die Elektrophoreseeinheit wurde mit Laufpuffer gefüllt und 25 mA wurden pro Gel angelegt.

**Tab. 5 Zusammensetzung Polyacrylamidgel**

Angaben in $\mu$ l	Trenngel (7,5 ml)	Sammelgel (5 ml)
Polyacrylamid 30%	3125	650
Aqua dest.	2417	3045
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	1875	0
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	0	1250
SDS 20%	37,5	25
TEMED	7,5	5
Ammoniumpersulfat 10%	37,5	25

### 2.2.7 Western Blot

Um Proteine spezifisch nachweisen zu können, wurde diese aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) übertragen. Dazu wurden vor dem Blotten die Membran (mit Methanol vorbehandelt), die Whatmann-Filter sowie das Gel für 15 min in Blotpuffer getränkt und anschließend in der Transferapparatur zu einem „Sandwich“ geschichtet. Dabei zeigten die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode. Auf beiden Seiten folgten jeweils die Filter. Die Schichtung wurde mit Blotpuffer durchtränkt und die Proteine im darauf folgenden Transfer unter Kühlung elektrophoretisch auf die PVDF-Membran übertragen (350 mA, 100 V, 90 min). Nach dem Waschen der geblotteten Membran mit TBS und 0,1% Tween 20 wurde diese zum Absättigen unspezifischer Bindungen mit 5% BSA/TBS/Tween 20 für 2 h geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (rabbit-anti-mouse Tyrosin-Hydroxylase, Millipore, Schwalbach) erfolgte in einer Konzentration von 1:500 in 5 ml 5% BSA/TBS/Tween 20 über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/Tween 20 wurde die Membran für 1 h mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (goat-anti-rabbit, Santa Cruz, Heidelberg) in einer Konzentration von 1:6000 in 6 ml 5% BSA/TBS/Tween 20 für 1 h inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen mit TBS/Tween 20 wurde zur Detektion das ECL-Plus Detektions-Kit (Amersham, Freiburg) verwendet. Die Chemilumineszenz (430 nm) wurde mit der Geldokumentationsanlage nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde die Membran nach der Inkubation mit rabbit-anti-mouse Tyrosin Hydroxylase zusätzlich noch mit Antikörpern (1:2000) gegen die Housekeeping-Proteine beta-Actin und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) behandelt.

### 2.2.8 Nachweis von Zytokinen

Die den Versuchstieren steril entnommenen Lymphknoten (inguinal, popliteal, subaortal) und Milzen wurden in supplementiertes RPMI 1640-Medium überführt, mit Pinzetten zerkleinert und zum Herstellen einer Einzelzell-Suspension durch ein Zellsieb gedrückt. Zur Beseitigung von Fettgewebe und Zelltrümmern wurden die Zellen mit 37 °C warmen Kulturmedium gewaschen. Die vorhandenen Erythrozyten wurden durch Zugabe von 3-4 ml Ammoniumchlorid/TRIS-Lösung lysiert. Das Abzentrifugieren erfolgte bei 1200 U/min für 6 min. Die Gesamtzellzahl wurde mit Trypanblau (1:10 in PBS) und Neubauer-Zählkammer bestimmt, die Zellen auf  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt und in 24-Well-Platten à 1 ml eingesät. Je nach Art der Stimulation wurde antigenspezifisch 25 µg/ml mBSA hinzugegeben bzw. die Wells T-Zell-Rezeptor-spezifisch vorher mit 2 mg anti-CD3-Antikörpern (1452CII; Hybridomüberstand) beschichtet. Nach 42 h Kultur im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Überstände geerntet, abzentrifugiert und bei -70 °C aufbewahrt. Mittels Sandwich-ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) wurde der Gehalt an Zytokinen gemessen. Diese Methode basiert auf 2 spezifischen Antikörpern für das Protein, die unterschiedliche Bindungsstellen besitzen. Hierfür werden die 96-Well-Platten zunächst über Nacht bei 4 °C mit den Primär-Antikörpern (50 µl/Well) und den entsprechenden Beladungspuffern beschichtet (Tab. 6). Für das Waschen der Mikrotiter-Platten zwischen den einzelnen Schritten wurde als Waschpuffer 0,05% Tween 20 in PBS verwendet. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 300 µl/Well 2% BSA in PBS blockiert. In Doppelbestimmung wurden von den Proben und Standards je 50 µl/Well aufgetragen und die Platten erneut über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Gemäß Tabelle 6 wurden die biotinylierten Sekundär-Antikörper in PBS mit 1% BSA und 0,05% Tween 20 zu je 100 µl/Well aufgetragen und diese nach einer spezifischen Inkubationszeit bei Raumtemperatur mit 100 µl/Well des Enzyms Streptavidin-Peroxidase (2 µl/Platte in PBS mit 1% BSA und 0,05% Tween 20) für 40 min gekoppelt. Die Zugabe von 100 µl Substratpuffer pro Well führt zu einer enzymatischen Farbreaktion, welche mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und deren Extinktion mit dem Absorptionsmessgerät Sunrise bei 492 nm und einer Referenz von 620 nm gemessen wird. Mit Hilfe einer Regressionsgleichung der Extinktionswerte und Konzentrationen der Standardreihe aus rekombinantem Zytokin (Tab. 7) konnte der Zytokingehalt der Proben berechnet werden.

**Tab. 6 ELISA-Antikörper**

Für die Zytokinbestimmung verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Zytokin	Klon	Konzentration	Markierung	Puffer	Hersteller
IFN- $\gamma$	R4-6A2	1 $\mu\text{g/ml}$	ohne	Na-Phos., pH 9,0	BD Pharmingen
	XMG1.2	0,5 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	BD Pharmingen
TNF- $\alpha$	G281-2626	3 $\mu\text{g/ml}$	ohne	Na-Phos., pH 6,5	BD Pharmingen
	MP6-XT3	0,5 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	BD Pharmingen
TGF- $\beta$	A75-2	2 $\mu\text{g/ml}$	ohne	Na-Phos., pH 9,0	BD Pharmingen
	A75-3	1 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	BD Pharmingen
IL-1 $\beta$	MAB401	4 $\mu\text{g/ml}$	ohne	NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,5	R&D Sytstems
	BAF401	0,5 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	R&D Sytstems
IL-2	JES6-1A12	1 $\mu\text{g/ml}$	ohne	Na-Phos., pH 9,0	BD Pharmingen
	JES6-5H4	0,5 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	BD Pharmingen
IL-4	BVD4-1D11	1 $\mu\text{g/ml}$	ohne	Na-Phos., pH 9,0	BD Pharmingen
	BVD6-24G2	0,1 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	BD Pharmingen
IL-5	TRFK5	1 $\mu\text{g/ml}$	ohne	NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,5	BD Pharmingen
	TRFK4	0,25 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	BD Pharmingen
IL-6	MP5-20F3	2 $\mu\text{g/ml}$	ohne	NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,5	BD Pharmingen
	MP5-32C11	0,25 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	BD Pharmingen
IL-10	JES5-2A5	6 $\mu\text{g/ml}$	ohne	Na-Phos., pH 6,5	BD Pharmingen
	554423	0,5 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	BD Pharmingen
IL-12	51-26611E	4 $\mu\text{l/ml}$	ohne	Na-Phos., pH 6,5	BD Pharmingen
	51-26612E	0,5 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	BD Pharmingen
IL-17	MAB721	2 $\mu\text{g/ml}$	ohne	PBS	R&D Sytstems
	BAF421	0,1 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	R&D Sytstems
IL-21	AF594	0,4 $\mu\text{g/ml}$	ohne	PBS	R&D Sytstems
	BAF594	0,1 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	R&D Sytstems
RANKL	AF462	0,4 $\mu\text{g/ml}$	ohne	PBS	R&D Sytstems
	BAF462	0,2 $\mu\text{g/ml}$	Biotin	-	R&D Sytstems

**Tab. 7 ELISA-Standards**

Für die Zytokinbestimmung verwendete Standards aus rekombinanten Zytokinen.

Zytokin	Cat.-Nr.	max. Standard-konzentration	Hersteller
IFN- $\gamma$	554587	5000 pg/ml	BD Pharmingen
TNF- $\alpha$	554589	2500 pg/ml	BD Pharmingen
TGF- $\beta$	555104	4000 pg/ml	BD Pharmingen
IL-1 $\beta$	MAB401	1000 pg/ml	R&D Sytstems
IL-2	212-12	2000 pg/ml	Tebu
IL-4	214-14	10000 pg/ml	Tebu
IL-5	554581	5000 pg/ml	BD Pharmingen
IL-6	216-16	5000 pg/ml	Tebu
IL-10	417-ML	4000 pg/ml	R&D Sytstems
IL-12	419-ML	4000 pg/ml	R&D Sytstems
IL-17	421-ML	10000 pg/ml	R&D Sytstems
IL-21	594-ML	4000 pg/ml	R&D Sytstems
RANKL	462-TR	4000 pg/ml	R&D Sytstems



### 2.2.9 Bestimmung von Antikörpern

Für den Nachweis von Antikörpern war zunächst die Gewinnung von Serum nötig. Hierzu wurde das koagulierte Blut der Versuchstiere bei 5.000 U/min abzentrifugiert und das Serum abpipettiert. Bis zur Durchführung des ELISA wurde es bei -70 °C aufbewahrt. Gemessen wurde im Folgenden die Menge an Gesamt-Immunglobulin G (IgG) und gegen mBSA, Kollagen Typ I (K I), Kollagen Typ II (K II) oder Proteoglykane (PG) gerichtetes IgG. Hierfür wurden 96-Well-Platten über Nacht bei 4 °C mit mBSA (100 ng/Well), K I, K II oder PG (jeweils 1 µg/Well) bzw. mit Antikörpern gegen IgG, IgG1, IgG2b und IgG3 (100 ng/Well) (Southern Biotech, Biozol, Eching) in NaHCO<sub>3</sub>-Puffer beschichtet. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 300 µl/Well 2% BSA in PBS bei Raumtemperatur für 2 h geblockt. Die Proben und Standards wurden anschließend in geeigneten Verdünnungen zu jeweils 50 µl/Well aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert (Tab. 8). Für die Bestimmung von K I, K II und PG wurden die Serum-Proben 1:100 verdünnt und die dazugehörigen Standards 1:50. Gepooltes C57BL/6-Mausserum vom Tag 7 der AIA diente als Referenz, auf den sich der gemessene Gehalt an antigen-spezifischem IgG in den Proben prozentual bezieht. Als Standard für IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b oder IgG3 dienten Myeloma-Antikörper der entsprechenden Isotypen (Sigma-Aldrich, Steinheim). Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Mikrotiter-Platten mit 0,05% Tween 20 in PBS gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurden polyklonale Ziege anti-Maus-Antikörper gegen IgG1, IgG2b und IgG3, konjugiert mit alkalischer Phosphatase bzw. gegen Gesamt-IgG, K I, K II und PG gerichtete und mit Peroxidase konjugierte Antikörper verwendet (alle Southern Biotech, Biozol, Eching). Als einzige Ausnahme war der sekundäre Antikörper für IgG2a biotinyliert (C57BL/6: Igh-C<sub>b</sub>-Haplotyp, BD Pharmingen, Heidelberg). Die Entwicklung der Antikörper-ELISA mit Biotin- und Peroxidase-gekoppelten Antikörpern erfolgte analog der Zytokin-Bestimmung (siehe 2.2.8). Für die alkalische Phosphatase wurde abweichend 100 µl/Well Para-Nitrophenylphosphat (pNPP) in Substratpuffer als Substrat verwendet. Die Extinktion wurde mit dem Absorptionsmessgerät bei 405 nm und einer Referenz von 690 nm gemessen.

**Tab. 8 Antikörper und Standards für Immunglobulin-ELISA**

Für die Immunglobulin-Bestimmung verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper sowie die Verdünnungen von Serum-Proben und Standards. AP Alkalische Phosphatase, PO Peroxidase.

Typ	Markierung	Probenverdünnung			
		mBSA	Standard	Gesamt	Standard
IgG	ohne PO	1 : 5000	1 : 250	1 : 50000	500 ng/ml
IgG1	ohne AP	1 : 1000	1 : 125	1 : 10000	500 ng/ml
IgG2a	- Biotin	1 : 1000	1 : 125	1 : 10000	500 ng/ml
IgG2b	ohne AP	1 : 1000	1 : 125	1 : 50000	500 ng/ml
IgG3	ohne AP	1 : 100	1 : 125	1 : 10000	500 ng/ml

**2.2.10 Test der Vitalität der T-Zellen**

Die zu untersuchenden T-Lymphozyten wurden wie zuvor beschrieben isoliert und zu  $1 \times 10^6$  Zellen/Well in einer 24-Well-Platte kultiviert (siehe 2.2.8). Nach der entsprechenden Behandlung mit pharmakologischen Wirkstoffen *in vitro* (Tab. 4) und 24 h Inkubationszeit bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> wurden das Medium abgenommen und die Zellen mit 200 µl PBS gespült. Anschließend wurden die adhärenenten Zellen mit 250 µl Trypsin (1:5 Verdünnung der Stammlösung) und 500 µl PBS gelöst, für 6 min bei 1600 U/min zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 1 ml kompletten RPMI-Medium aufgenommen. Zum Zählen der vitalen, nicht angefärbten Zellen mit der Neubauer-Zählkammer wurden 50 µl Trypanblau (1:10 in PBS) mit 50 µl der Zellsuspension gemischt. Die Differenz zwischen eingesäten Zellen und nach Inkubation ausgezählten vitalen Zellen bei der unbehandelten Negativkontrolle stellt die natürliche Minderung dar. Die Abweichungen von diesem Wert geben für die jeweilig untersuchten Substanzen Aufschluss über deren toxisches Potenzial.

**2.2.11 Quantifizierung der Proliferation der T-Zellen**

Durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin bei der Zellteilung lässt sich die Proliferation von Zellen quantifizieren. Hierfür wurden Lymphozyten wie zuvor beschrieben aus sympathektomierten oder unbehandelten AIA-Kontrolltieren isoliert und stimuliert (siehe 2.2.8). Zur Beurteilung der Einflussnahme pharmakologischer Wirkstoffe auf das Teilungsvermögen der Zellen wurden diese *in vitro* zusammen mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen 40 h kultiviert. Um die Proliferation zu messen, wurde während der letzten 18 h der Kultur 0,5 µCi/Well

[3H]-Thymidin hinzugefügt. Im Labor der AG Gynäkologische Molekularbiologie (Universitätsfrauenklinik Jena) wurden die Zellen anschließend mit dem Zellharvester Unifilter-96 auf Unifilter-96-Well GF/C-Platten geerntet. Nach dem Trocknen der Platten und Zugabe von 30 µl/Well Szintillationscocktail Microscint O konnte der Einbau von radioaktiv markiertem [3H]-Thymidin in die DNA mit dem Szintillations-Zähler TopCount gemessen werden.

### **2.2.12 Makrophagenpräparation und –kultur**

Für die Gewinnung der Peritonealmakrophagen wurden die unbehandelten C57BL/6-Mäuse nach Ethernarkose zunächst durch Aufschneiden der Karotiden ausgeblutet und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die Desinfektion erfolgte durch Eintauchen der Mäuse in 70% Ethanol und die nachfolgende Zellpräparation wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach Freilegen des Peritoneums wurde der Bauchraum unter leichter Massage vorsichtig mit 4 ml gekühlter Heparinlösung (20 µl/100 ml PBS) gespült. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und das gewonnene Exsudat in Zentrifugenröhrchen gesammelt, die zur Vermeidung der Adhärenz der Makrophagen ebenfalls gekühlt wurden. Nachfolgend wurden die Proben bei 1200 U/min 8 min zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das entstandene Zellpellet wurde in 5 ml kalter PBS-Lösung wieder aufgenommen und der Waschvorgang wiederholt. Nach Aufnahme des Pellets in komplettem kaltem RPMI-Medium wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau gemischt, die nicht eingefärbten Zellen mit der Neubauer-Zählkammer gezählt und auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Zur Separation der Makrophagen ließ man die Zellen für 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> auf 24-Well-Kulturplatten adhären (1 ml/Well). Nach vorsichtigem Absaugen des Mediums wurden die Platten zweimalig mit warmem Spülmedium gewaschen, um anschließend wieder pro Well 1 ml komplettes RPMI-Medium bzw. serumfreies Makrophagenmedium (SFM) zur TNFα-Bestimmung zuzugeben. Die somit erhaltenen Zellen sind morphologisch und funktionell zu >95% Makrophagen<sup>83</sup>. Die anschließende Inkubation für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte bei unterschiedlichen Bedingungen. Zur Stimulierung wurde 10 ng LPS/Well und 100 U IFNγ/Well zugegeben. In Kombination hierzu wurde ebenso die Wirksamkeit verschiedener Adrenozeptor-Antagonisten und –Agonisten bzw. 6-OHDA getestet (Tab. 4). Deren Konzentration betrug jeweils 100 µM und die Inkubationszeit lag bei 1 oder 24 h. Die Zugabe dieser Substanzen ins Kulturmedium erfolgte jeweils 1 h vor der Stimulierung der Zellen. Nach dem Ende der Kultivierung wurden die Überstände abgesaugt und zum Entfernen von Zellresten für 8 min bei 3000 U/min und 4°C zentrifugiert. Bis zur Bestimmung der Zytokine (IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12,

TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ ) wurden die Proben portioniert bei -70°C eingefroren. Der ELISA erfolgte analog der zuvor beschriebenen Methode (siehe 2.2.8).

### 2.2.13 Messung des Aktivitätszustandes der Makrophagen - NO-Test

In Abhängigkeit vom Aktivitätszustand der Makrophagen produziert die intrazelluläre Stickoxidsynthase bei der Umwandlung von L-Arginin in Citrullin Stickstoffmonoxid (NO), welches in Lösung zu HNO<sub>2</sub> reagiert. Dieses wiederum dissoziiert in H<sup>+</sup> und NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, welches in seiner Menge proportional der Aktivität der Stickoxidsynthase ist und mit der Griess-Reaktion nachgewiesen werden kann<sup>81,82</sup>. Es wurden 100 µl der Überstände der Makrophagenkultur in ein Well einer 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte gegeben und dazu 100 µl Griess-Reagens pipetiert. Die Extinktion konnte sofort mit dem Absorptionsmessgerät Sunrise bei 570 nm und einer Referenz von 690 nm gemessen werden. Als Standard diente eine 0,1 mM Natriumnitrit-Lösung und als Negativkontrolle wurde RPMI-Medium verwendet. Die Berechnung des Nitritgehaltes der Proben erfolgte nach Abzug des Extinktionswertes der Negativkontrolle und Vergleich mit der Standardverdünnung.

### 2.2.14 Erfassung von Schmerzschwellen

Das nozizeptive Verhalten im Verlauf der Antigen-induzierten Arthritis wurde über mechanische und thermische Reize an der Fußsohle untersucht. Hierbei kamen Testverfahren zur Anwendung, die keine persistierenden Schmerzzustände verursachen und nicht zu einer Gewebeschädigung führen.

Die sekundäre Hyperalgesie an der arthritischen Extremität kann als Latenzzeit gemessen werden. Dabei ziehen die Versuchstiere ihre Pfote als Reaktion auf einen noxischen Reiz ab einer bestimmten Schmerzschwelle zurück. Exakt zu diesem Zeitpunkt wird der entsprechende Reiz beendet.

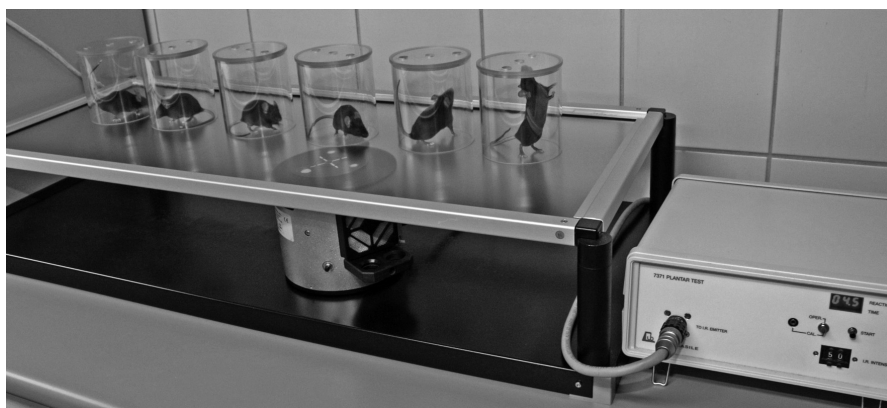
Als **mechanischer Stimulus** wird hierfür mit einem Dynamic Plantar Aesthesiometer ein innerhalb von 10 Sekunden linear ansteigender Druck, entsprechend bis zu 10 Gramm, auf die Fußsohle der Pfote an der arthritischen Extremität ausgeübt. Anhand der gemessenen Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote kann die sekundäre Hyperalgesie bestimmt werden. Die Mäuse befinden sich hierfür einzeln in nach unten geöffneten Plastikboxen und werden nach einer Eingewöhnungszeit von 15 min nacheinander getestet. Es wurde stets darauf geachtet, dass sich das Tier ruhig verhielt und nicht durch Putzen oder Kratzen abgelenkt war (Abb. 5).



**Abb. 5 Dynamic Plantar Aesthesiometer**

Je Versuchstag wurden die Mäuse in 4 Durchgängen gemessen. Zum Erhalten eines Normalwertes (Baseline) wurden 1 und 2 Wochen vor dem Auslösen der Arthritis Vortestungen durchgeführt, deren Messergebnisse zu einem Mittelwert zusammengefasst wurden. Die Abweichungen zu diesem Wert wurden prozentual als Maß der sekundären Hyperalgesie im Verlauf der AIA betrachtet.

Zur Ermittlung der **thermischen Hyperalgesie** wurde mit einem Plantar Test die Methode nach Hargreaves angewandt<sup>57</sup>. Hierbei wird über Infrarotlicht vermittelte Hitze als Stimulus verwendet. Das Anheben der Pfote als Reaktion auf den noxischen Reiz wurde als Latenzzeit und damit als Maß für die sekundäre Hyperalgesie gewertet. Die Mäuse befanden sich hierfür voneinander separiert auf einer Plexiglasscheibe, durch die der standardisierte Wärmereiz von unten auf den Plantarbereich der Pfote gesetzt wurde (Abb. 6). Je Versuchstag wurden die Mäuse in 3 Durchgängen getestet. Das Protokoll der Vortestungen und Auswertung entspricht der zuvor beschriebenen Methode.



**Abb. 6 Plantar Test nach Hargreaves**

**2.2.15 Statistische Auswertung und Darstellung**

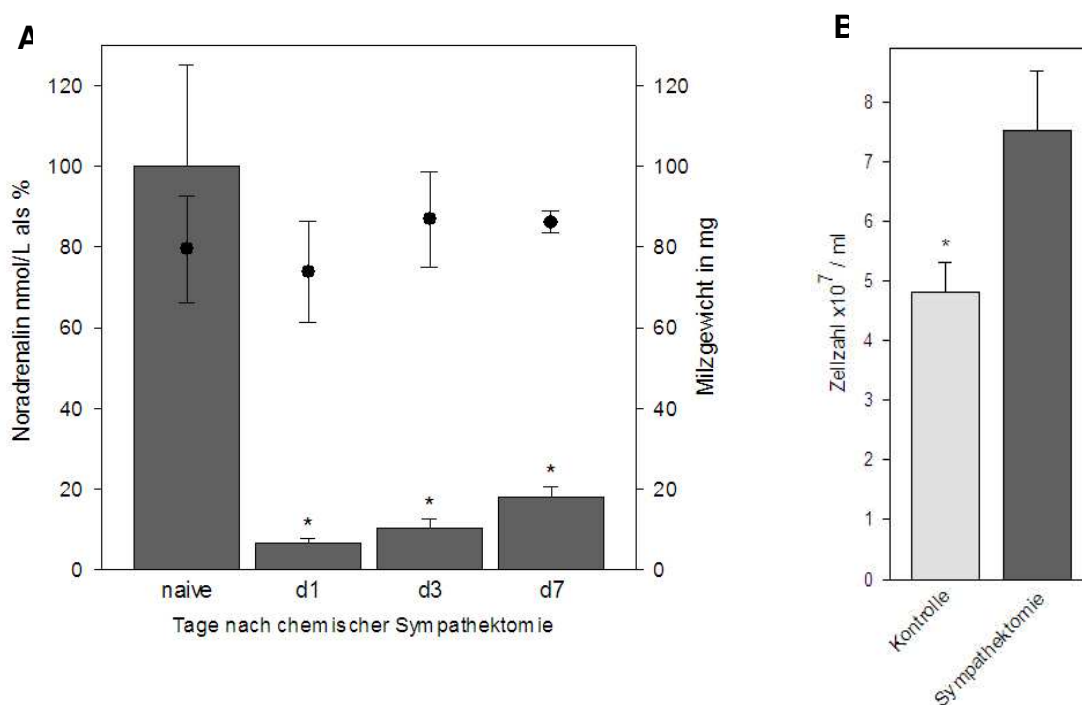
Mit der Statistik-Software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) wurden die Untersuchungen auf signifikante Unterschiede zwischen den Messergebnissen der Versuchsgruppen durchgeführt. Hierfür wurden der T-Test beim Mittelwertvergleich unabhängiger Stichproben und der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test verwendet. Für ein Signifikanzniveau ( $p$ ) < 0,05 (\*  $p$  < 0,05, \*\*  $p$  < 0,01, \*\*\*  $p$  < 0,001) wurden statistische Unterschiede als signifikant betrachtet. Die Diagramme wurden mit der Software SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Erkrath) erstellt. Hierbei wird der arithmetische Mittelwert der Ergebnisse der jeweiligen Versuchsgruppen zusammen mit dem Mittelwert des Standardfehlers (SEM) graphisch dargestellt. Für Fotoaufnahmen wurden die Kameras EOS 450 und PowerShot G5 (Canon, Krefeld) sowie die Software Photoshop 4.0 (Adobe Systems, München) verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Wirkungsnachweis der chemischen Sympathektomie

Für den Nachweis neuroimmunologischer Wechselwirkungen und zur Bestimmung der Rolle des sympathischen Nervensystems (SNS) im Verlauf der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) musste zunächst die Wirksamkeit der chemischen Sympathektomie gezeigt werden.

Das Ziel der intraperitonealen Applikation des Neurotoxins 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) war es, durch die Zerstörung der noradrenergen Nervenendigungen die Denervation des peripheren Nervensystems einschließlich der sekundären lymphatischen Organe zu erreichen. Dieser Nachweis wurde mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) geführt (Abb. 7A). Milzgewebe von sympathektomierten Versuchstieren wies dabei eine signifikante Verringerung des Noradrenalingehaltes um bis zu 93% im Vergleich zu naiven unbehandelten Tieren auf. Diese Reduktion des Neurotransmitters blieb in den Tagen nach der Sympathektomie bestehen und erreichte erst am Tag 35 nach Applikation wieder einen Wert von 83% der Kontrollgruppe.



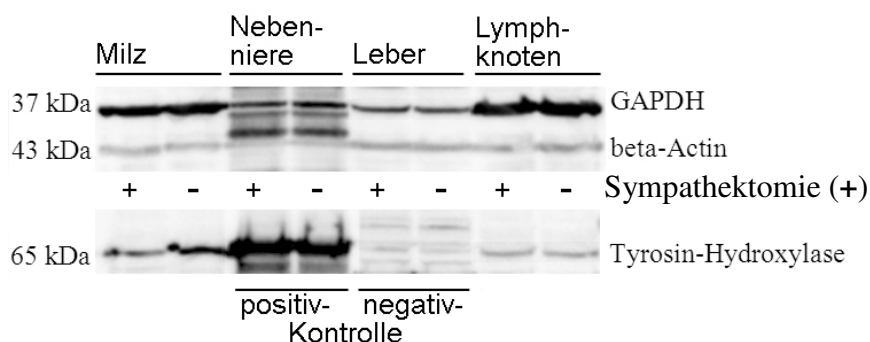
**Abb. 7 Einfluss der chemischen Sympathektomie auf die Milz**

Die chemische Sympathektomie mit 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) führte bei den Versuchstieren zu einer signifikanten Verringerung des Noradrenalingehaltes in der Milz (**A**) (100% = 177 nmol/L). Das Milzgewicht (**A**, schwarze Punkte) sowie die Zahl an Lymphozyten (**B**) (Tag 3 nach Sympathektomie) wurden hingegen nicht verringert (\*  $p < 0,05$ ).

In den Milzen neonatal sympathektomierter Mäuse konnte chromatographisch kein Noradrenalin nachgewiesen werden.

Um sicherzustellen, dass die chemische Sympathektomie lediglich Einfluss auf die Menge an Katecholaminen nimmt und die Milz als eines für die Entzündungsreaktion essentielles Organ nicht per se schädigt, wurden ebenfalls das Milzgewicht (Abb. 7A) und die Zahl an Lymphozyten (Abb. 7B) dokumentiert. Hierbei konnte weder eine Vergrößerung der Milz (Splenomegalie) noch eine Abnahme der Zahl an Lymphozyten festgestellt werden.

Als ein weiteres Kriterium der erfolgreich durchgeführten chemischen Sympathektomie ist der Nachweis von Tyrosin-Hydroxylase (TH) zu sehen. Dieses Schlüsselenzym der Noradrenalin synthese wird in den Nebennieren gebildet und oxidiert in den Nervenzellen Tyrosin zu DOPA (Dihydroxyphenylalanin). Werden die sympathischen Nervenendigungen durch 6-OHDA zerstört, ist nach Acheson et al. im betroffenen Gewebe neben dem Verlust von Noradrenalin auch eine Abnahme von TH zu erkennen<sup>1</sup>. Dies konnte mittels Western Blot im Milzgewebe von sympathektomierten Mäusen gezeigt werden (Abb. 8). Gewebeproben aus Nebenniere und Leber dienten nach Angabe vom Hersteller des Primärantikörpers als Positiv- bzw. Negativkontrolle. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und beta-Actin wurden als Housekeeping-Proteine verwendet.



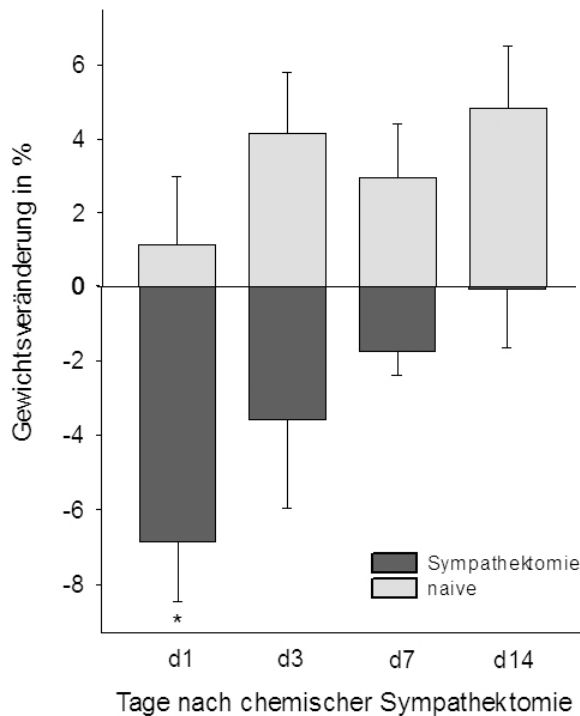
### Abb. 8 Einfluss der chemischen Sympathektomie auf den Gehalt an Tyrosin-Hydroxylase

Der Gehalt des für die Synthese von Noradrenalin essentiellen Enzyms Tyrosinhydroxylase wurde in der Milz von sympathektomierten Tieren (+) im Vergleich zu naiven Kontrollen (-) verringert. GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

Des Weiteren konnte bei den sympathektomierten Tieren nach Gabe von 6-OHDA eine kurzzeitige signifikante Gewichtsreduzierung festgestellt werden, welche sich jedoch im weiteren Verlauf wieder dem Ausgangswert vor der Applikation anglich (Abb. 9). Dieses Phänomen wird durch einen gesteigerten Energieumsatz ohne



kompensierend erhöhte Nahrungsaufnahme erklärt und wurde von Billes und Cowley am Beispiel der intraperitonealen Administration von selektiven Dopamin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmern beschrieben<sup>13,14</sup>. Als Folge der Sympathektomie zeigten die Versuchstiere keine weiteren äußeren Veränderungen oder Einschränkungen ihrer Vitalfunktionen.



**Abb. 9 Einfluss der chemischen Sympathektomie auf das Gewicht der Versuchstiere.**

Während das Gewicht naiver 6-8 Wochen alter Versuchstiere kontinuierlich zunimmt, führt eine chemische Sympathektomie direkt nach der Gabe von 6-Hydroxydopamin zu einem kurzzeitigen Gewichtsverlust (\*  $p < 0,05$ ).

### 3.1.1 Zusammenfassung

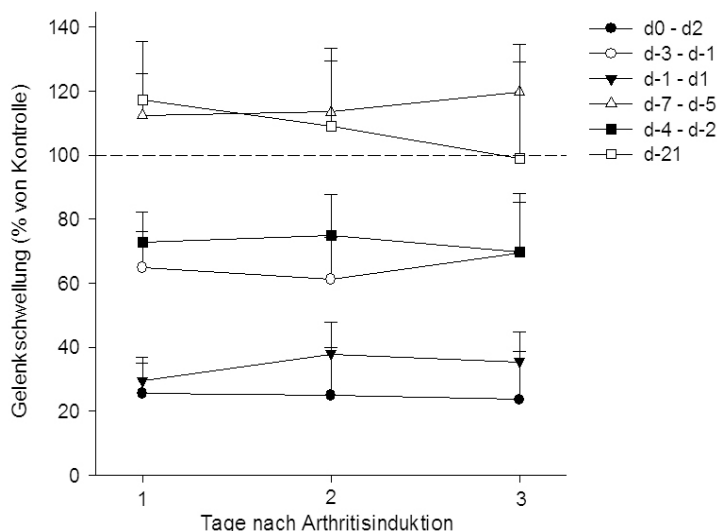
Durch die chemische Sympathektomie sollten die peripher noradrenergen Nervenendigungen zerstört werden, um damit eine Einflussnahme des SNS im Verlauf der AIA zeigen zu können. Der Nachweis zur Sympathektomie konnte mittels HPLC und Western Blot erbracht werden, indem die Verringerung des Gehalts an Noradrenalin und Tyrosin-Hydroxylase in den sekundären lymphatischen Organen gezeigt wurde. Dabei wiesen die untersuchten Organe keine pathologischen Veränderungen auf und die Versuchstiere zeigten neben einer vorübergehenden Gewichtsreduzierung normale Vitalfunktionen.

## 3.2 Einfluss der Sympathektomie auf den Verlauf der AIA *in vivo*

### 3.2.1 Zeitpunkt und Konzentration

Im AIA-Modell wird die antigenspezifische Immunantwort nach zuvor erfolgter zweimaliger Immunisierung am Tag 0 ausgelöst. Nach der intraartikulären Applikation des Antigens kommt es zur Immunkomplexbildung und einer akuten Entzündungsreaktion. Diese ist durch die Infiltration von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Lymphozyten in das Kniegelenk gekennzeichnet. Sie dauert ~5 Tage an und geht in die chronische Phase über. Um die Einflussnahme des sympathischen Nervensystems (SNS) auf diese initiale Immunreaktion bestimmen zu können, mussten zunächst die optimalen Parameter für die Denervation ermittelt werden. Hierzu zählen der Zeitpunkt der Applikation (Abb. 10) und die Konzentration des verwendeten Neurotoxins 6-Hydroxydopamin (Abb. 11).

Die getesteten Zeitpunkte umfassten eine Spanne von 3 Wochen, beginnend mit dem Tag der ersten Immunisierung (d-21) bis 2 Tage nach Auslösen der AIA. Abbildung 10 zeigt, dass die Denervation zum Zeitpunkt der intraartikulären Applikation des Antigens (d-1 - d1 und d0 - d2) den deutlichsten Effekt zur Reduzierung der Gelenkschwellung, verglichen mit der unbehandelten AIA-Kontrollgruppe, bewirkt. Eine zeitigere Sympathektomie, beginnend am Tag -3 bis hin zum Tag -21, schwächt diese Einflussnahme kontinuierlich ab.

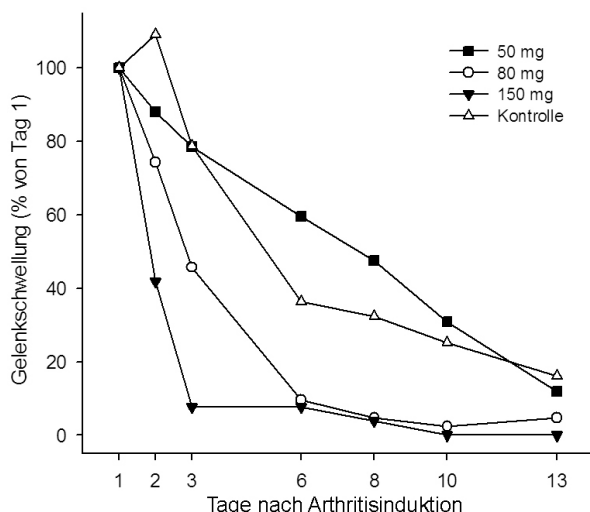


#### Abb. 10 Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der chemischen Sympathektomie

Die Applikation von 6-OHDA erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten vor, während und nach dem Auslösen der AIA intraperitoneal. 100% der Gelenkschwellung entsprechen dem Wert der jeweilig unbehandelten AIA-Kontrollgruppe.

Neben dem Zeitpunkt der Gabe von 6-Hydroxydopamin hängt dessen Wirkung auch von der eingesetzten Konzentration ab. Hierzu wurden verschiedene Dosen des Neurotoxins am Tag 0 intraperitoneal (i.p.) appliziert und deren Effekt auf die Verminderung der Gelenkschwellung dokumentiert. In Abbildung 11 ist zu

erkennen, dass die schwellungssenkende Wirkung der Sympathektomie in der akuten Phase der AIA mit steigender Konzentration zunimmt. Somit wird am Tag 3 für eine Dosis von 150 mg 6-OHDA/kg Körpermasse der Wert der Gelenkschwellung um 90% vermindert, während 50 mg 6-OHDA keinen Unterschied zur nicht-sympathektomierten Kontrollgruppe aufweisen.

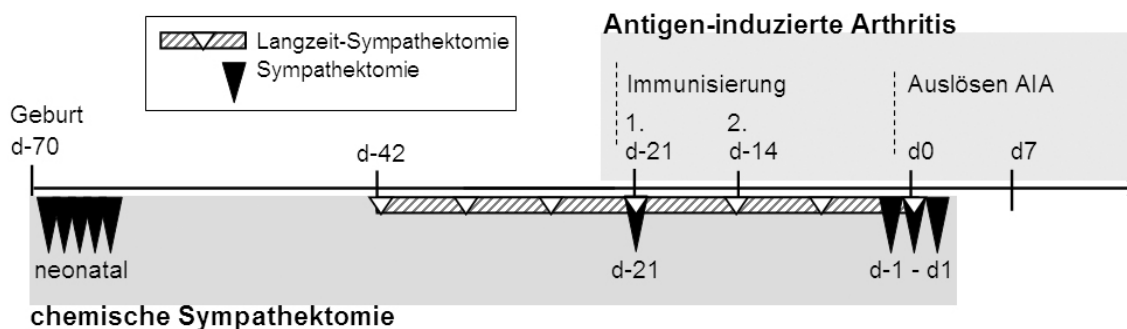


**Abb. 11 Bestimmung der effektiven 6-OHDA- Konzentration.**

Verschiedene Konzentrationen (mg/kg) von 6-OHDA wurden am Tag 0 der AIA i.p. appliziert. Die Schwellungswerte geben den jeweilig prozentualen Anteil der Gelenkschwellung vom Tag 1 wieder. Die Kontrolle entspricht der nicht-sympathektomierten AIA-Gruppe.

Neben der so ermittelten wirksamsten Kombination von 150 mg 6-OHDA/kg, appliziert zum Zeitpunkt des Auslösens der AIA, wurden noch zwei weitere experimentelle Schemata untersucht. Diese umfassten die neonatale sowie eine Langzeit-Sympathektomie (Abb. 12).

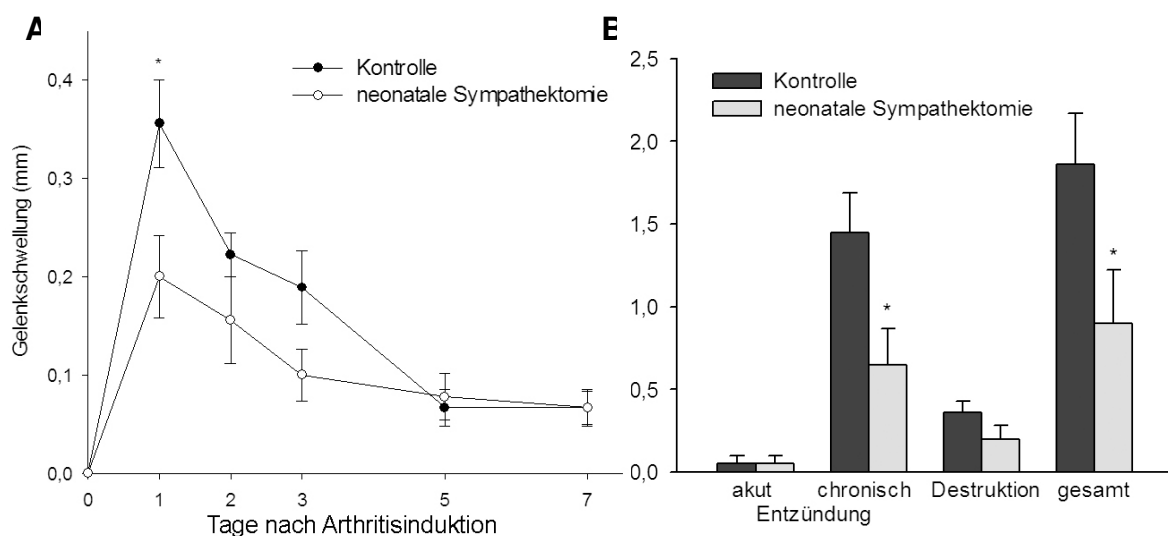
Bei der **neonatalen Sympathektomie** wurde den Versuchstieren täglich an 5 aufeinander folgenden Tagen, beginnend <24h nach der Geburt, 150 mg 6-OHDA/kg i.p. verabreicht.



**Abb. 12 Zeitschema der Sympathektomie im Verlauf der AIA**

Die Immunisierung gegen mBSA begann nach Standard-Protokoll im Alter von 7 Wochen. Im Verlauf der akuten Entzündungsreaktion wurde anschließend die

Gelenkschwellung dokumentiert sowie das histologische Bild am Tag 7 bewertet (Abb. 13, 15). Es zeigten sich hierbei trotz der sehr frühen Sympathektomie signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die gemessenen Werte der Gelenkschwellung waren ebenso wie die Parameter für chronische Entzündung und Destruktion bei den neonatal sympathektomierten Tieren niedriger als in der AIA-Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis war nicht unerwartet, da Levine et. al bereits 1986 eine anti-inflammatorische Wirkung von neonatal verabreichtem Capsaicin am Modell der Adjuvans-Arthritis der Ratte nachgewiesen hatten<sup>89</sup>. Capsaicin ist ein Alkaloid aus Pflanzen der Gattung *Capsicum*, welches als Neurotoxin durch die Bindung an den TRPV1-Ionenkanal (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) depolarisierend auf sensorische C-Faser-Neurone wirkt.



### Abb. 13 Neonatale Sympathektomie

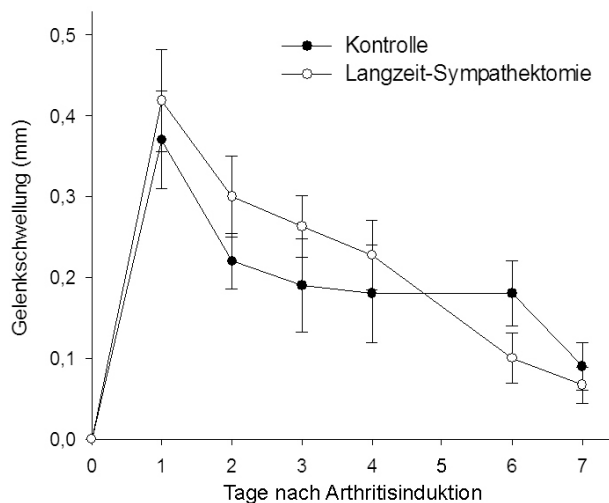
C57BL/6-Mäuse wurden neonatal chemisch sympathektomiert. Im Alter von 10 Wochen wurde die AIA ausgelöst, im weiteren Verlauf die Gelenkschwellung gemessen (**A**) und das histologische Bild der Arthritis am Tag 7 bewertet (**B**).

Da durch die neonatale Sympathektomie eine Milderung des AIA-Verlaufs erreicht wurde, dieser Effekt aber bei Sympathektomie zum Zeitpunkt der ersten Immunisierung am Tag -21 ausblieb (Abb. 10), wurde am Schema einer **Langzeit-Sympathektomie** untersucht, inwiefern der dazwischenliegende Zeitraum relevant für eine Modulation des Entzündungsgeschehens ist.

Ein positiver Einfluss auf die Schwere der Entzündung konnte jedoch weder anhand der Werte der Gelenkschwellung (Abb. 14) noch im histologischen Bild (Abb. 15) nachgewiesen werden. Tendenziell lagen die Daten ähnlich der Sympathektomie am Tag -21 noch über der unbehandelten AIA-Kontrollgruppe.

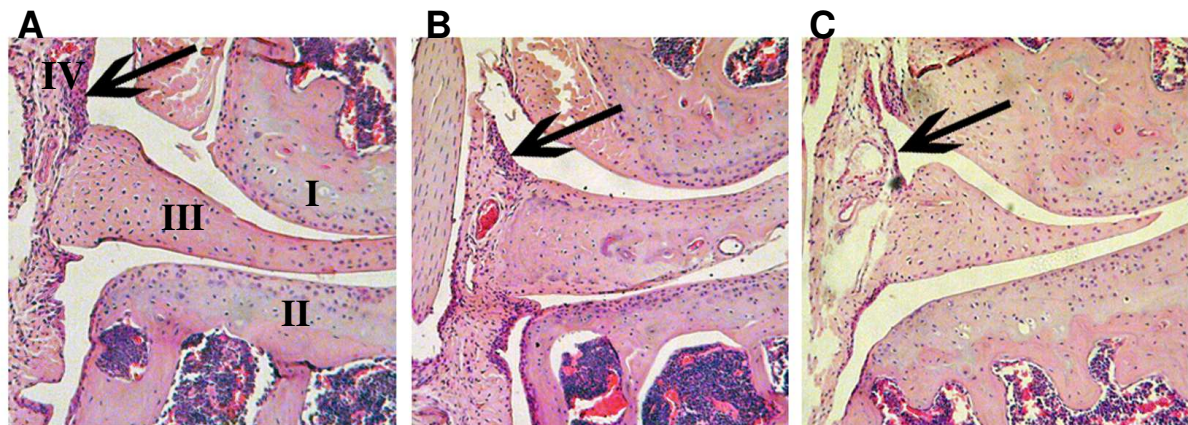
Ein Vergleich der histologischen Bilder vom Tag 7 der AIA ist in Abbildung 15 dargestellt. Insbesondere die Schwere der synovialen Hyperplasie als Zeichen der

chronischen Entzündung weist zwischen den verschiedenen Schemata der Sympathektomie Unterschiede auf. Diesbezüglich ist bei den Tieren mit Langzeitsympathektomie im Vergleich zur AIA-Kontrolle kein Unterschied erkennbar. Nach neonataler Sympathektomie ist jedoch entsprechend den geringeren Werten der Gelenkschwellung die Hyperplasie der Deckzellschicht deutlich geringer ausgeprägt.



#### Abb. 14 Langzeitsympathektomie

Die Versuchstiere wurden über einen Zeitraum von 6 Wochen aller 7 Tage, beginnend 3 Wochen vor der ersten Immunisierung, sympathektomiert. Schema siehe Abbildung 12.

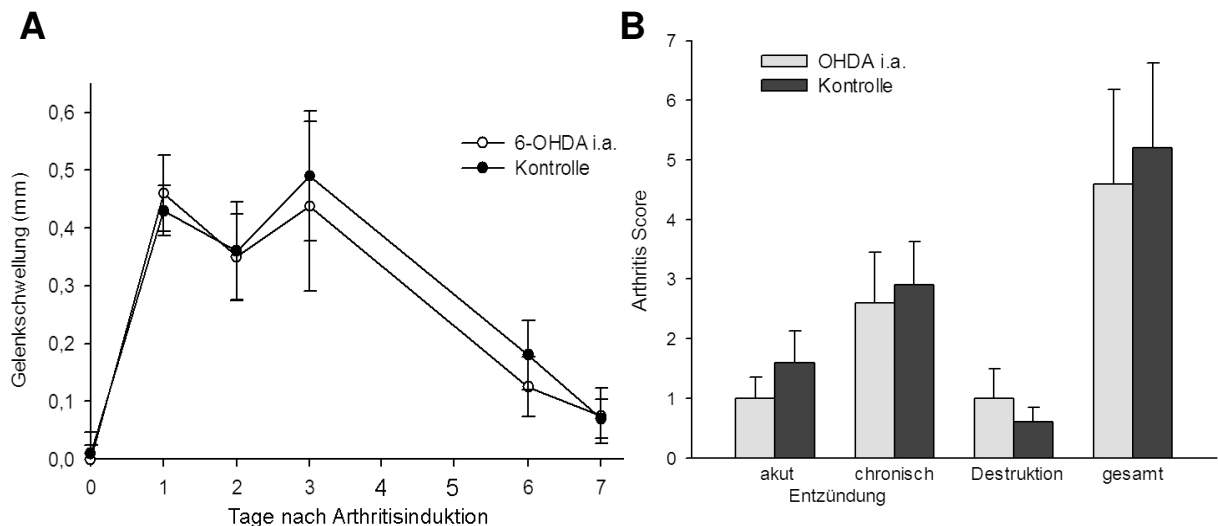


#### Abb. 15 Histologie der AIA am Tag 7

(A) Schnitt eines Kniegelenkes; I, Femur; II, Tibia; III, Meniskus; IV, Synovialmembran. Zu erkennen ist der unterschiedliche Grad der synovialen Hyperplasie als Parameter für die chronische Entzündung im Vergleich zwischen der unbehandelten AIA-Kontrollgruppe (A), nach Langzeitsympathektomie (B) und neonataler Sympathektomie (C). Die verstärkte Proliferation der synovialen Fibroblasten (Pfeile) bei der AIA wird durch die neonatale Sympathektomie reduziert. HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung.

Als Nachweis, dass der immunmodulatorische Einfluss der chemischen Sympathektomie auf die in Kapitel 3.1 gezeigten Veränderungen in den sekundären lymphatischen Organen zurückzuführen ist, wurde 6-OHDA 2 Tage vor dem

Auslösen der AIA (d-2) intraartikulär appliziert. In der nachfolgenden Entzündungsreaktion konnten keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren festgestellt werden, wie es sie bei der systemisch (i.p.) durchgeführten Sympathektomie gab. Weder die Werte der Gelenkschwellung noch die histologischen Entzündungszeichen wichen von den Daten der Kontrolle ab (Abb. 16).



**Abb. 16 Intraartikuläre 6-OHDA-Applikation.**

2 Tage vor Auslösen der AIA (d-2) wurde das Neurotoxin 6-OHDA ipsilateral intraartikulär appliziert. Die Gelenkschwellung (**A**) sowie die histologischen Veränderungen am Tag 7 (**B**) wurden in der akuten Phase der Arthritis bestimmt.

### 3.2.2 Charakterisierung der akuten Phase (d3)

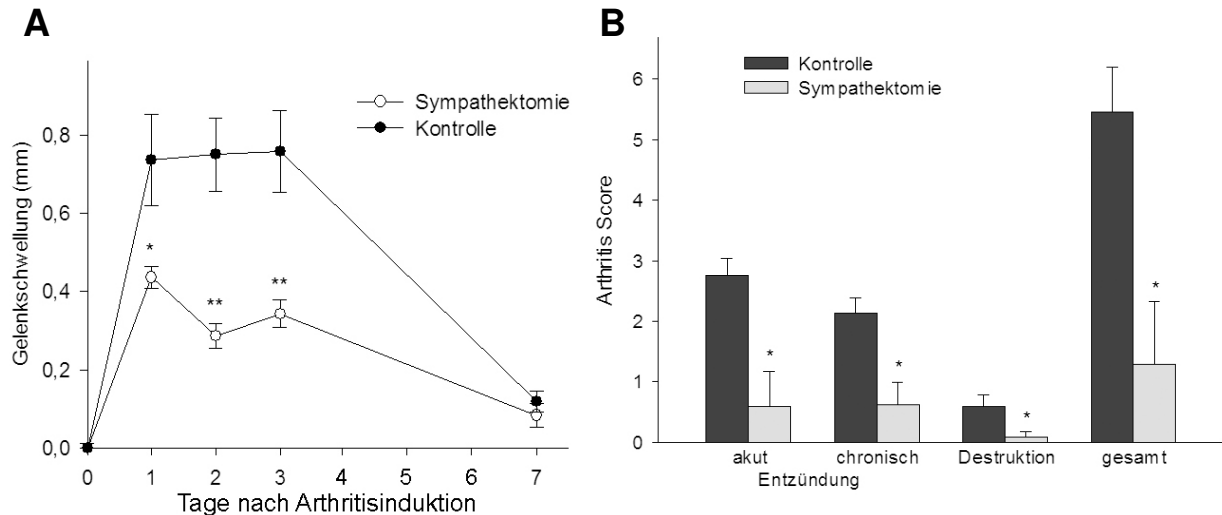
#### 3.2.2.1 Arthritisverlauf

Bei der Antigen-induzierten Arthritis handelt es sich um ein T-Zell-abhängiges Modell der rheumatoiden Arthritis, in dessen Verlauf es zur Infiltration von Immunzellen in das betroffene Gelenk und das periartikuläre Gewebe kommt. Die pathologischen Veränderungen des Gelenks (Knorpel- und Knochendestruktion) werden durch die synoviale Hyperplasie bedingt.

Da lymphatische Organe vegetativ sympathisch innerviert werden und Immunzellen nachweislich Rezeptoren für Neurotransmitter exprimieren, gilt die Interaktion zwischen Immun- und Nervensystem inzwischen als bewiesen. Die Rolle, die das sympathische Nervensystem hierbei einnehmen kann, variiert hingegen stark. Versuche am Modell der Kollagen-induzierten Arthritis konnten sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften des SNS aufzeigen<sup>58</sup>.

Die chemische Sympathektomie an den Tagen d-1 – d1 führte in der akuten Phase der AIA sowohl auf der Ebene der Gelenkschwellung als auch im histologischen Bild zu einem milderem Verlauf der Entzündung (Abb. 17). Die Schwellungswerte

lagen bis zum Tag 3 signifikant unter denen der unbehandelten Kontrolltiere und glichen sich erst am Tag 7 mit Beginn der chronischen Phase einander an. Der weitere Entzündungsverlauf lief in den 2 Gruppen gleich ab und zeigte keine Unterschiede.

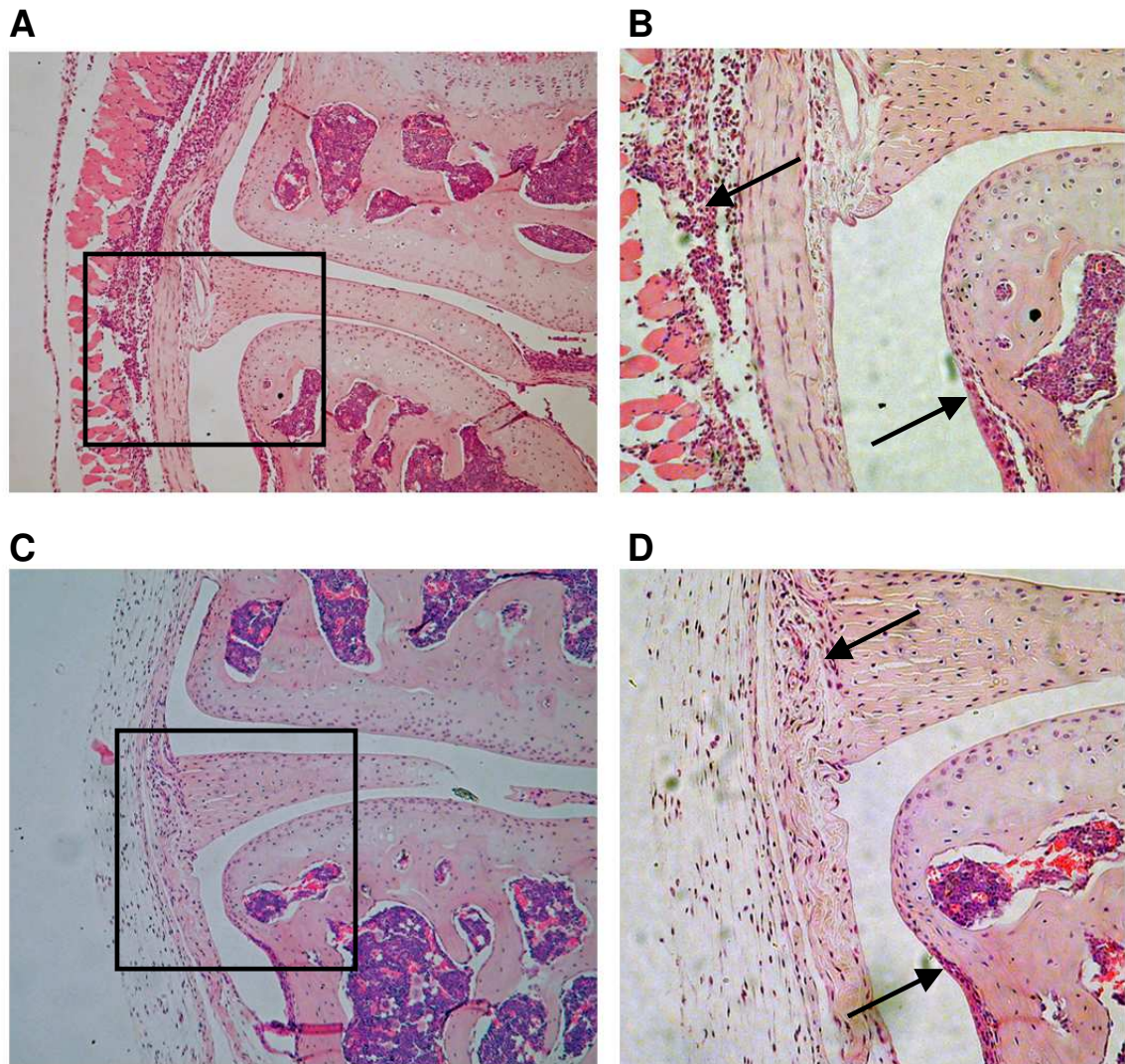


### Abb. 17 Einfluss der Sympathektomie in der akuten Phase der AIA

Nach Sympathektomie an den Tagen d-1, d0 und d1 zeigten die denervierten Mäuse sowohl signifikant geringere Werte der Gelenkschwellung (**A**), als auch verminderte Parameter für Entzündung und Destruktion im histologischen Bild am Tag 3 (**B**).

Die histologische Bewertung der Entzündung am Tag 3 ergab bei den sympathektomierten Tieren nur eine sehr geringe granulozytäre und mononukleäre Infiltration sowie eine kaum ausgeprägte synoviale Hyperplasie. Knorpel- und Knochendestruktionen waren kaum feststellbar (Abb. 17B). Demgegenüber wiesen die AIA-Kontrolltiere eine dichte granulozytäre Infiltration in die Synovialmembran als Zeichen der akuten Entzündung und mäßige mononukleäre Infiltration mit fleckförmiger Hyperplasie als Charakteristikum chronischer Entzündung auf. Kleinere Gewebsdefekte in Form von Knorpeldestruktion waren vereinzelt feststellbar. Abbildung 18 zeigt am Beispiel zweier Kniegelenkschnitte die unterschiedlichen histologischen Bilder von sympathektomierten und AIA-Kontrolltieren.





**Abb. 18 Histologie der AIA am Tag 3**

Die Parameter für akute und chronische Entzündung sind in den unbehandelten AIA-Kontrollen (**A, B**) stärker ausgeprägt als bei sympathektomierten Tieren (**C, D**). Besonders die Unterschiede der zellulären Infiltration der Synovialmembran sowie die synoviale Hyperplasie sind deutlich erkennbar (Pfeile). HE-Färbung. (A, C) 10-fache, (B, D) 20-fache Vergrößerung.

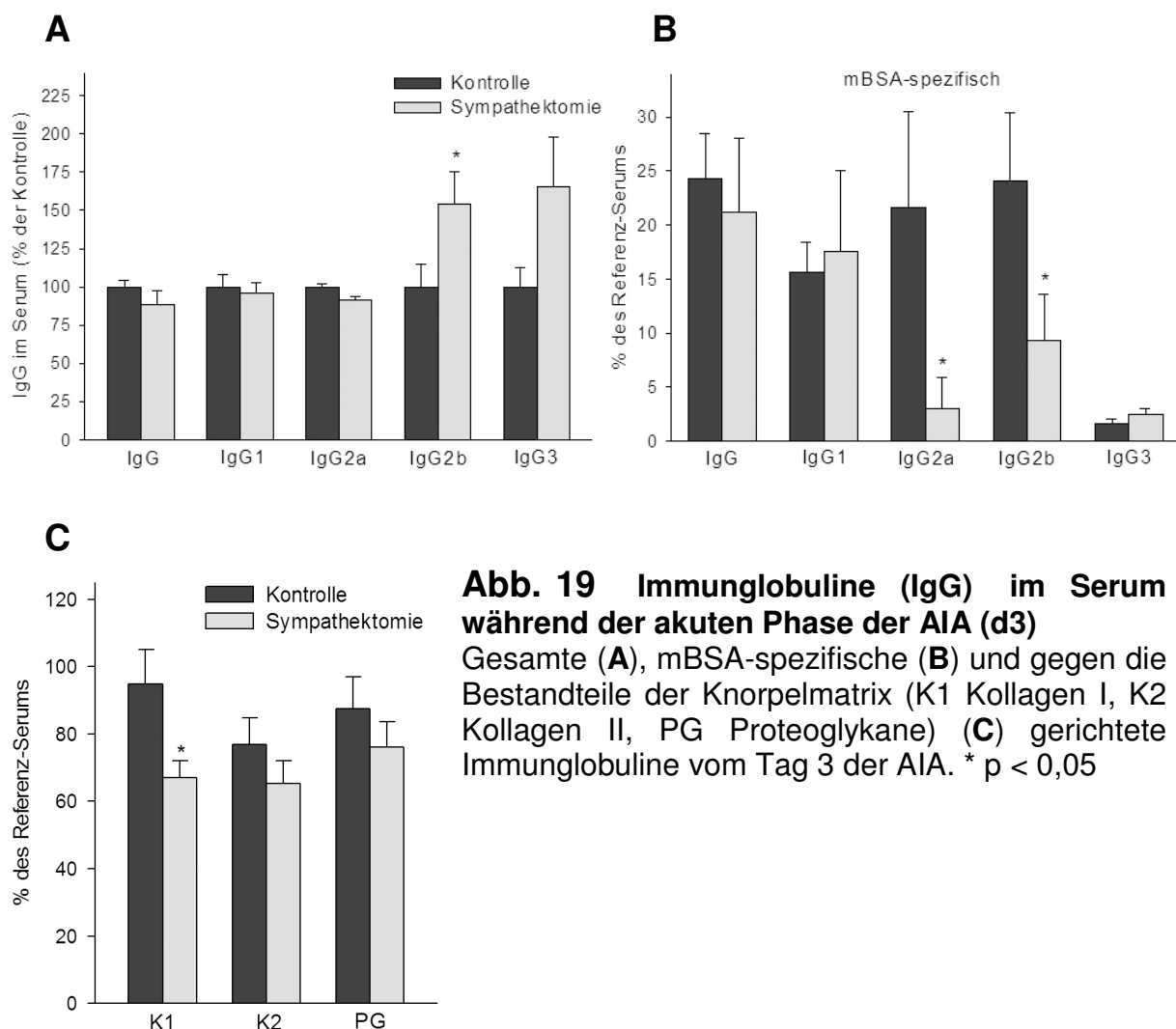
### 3.2.2.2 Immunparameter

Der Gehalt an **Immunglobulin G** (IgG) im Serum ist als immunologischer Parameter der Entzündungsreaktion zu sehen. IgG wird von Plasmazellen sezerniert und vor allem in der sekundären Immunantwort, beim zweiten Kontakt mit dem Antigen nach der Immunisierungsphase, in hohem Maß gebildet.

Bei der Konzentrationsbestimmung wird zwischen unspezifischem Gesamt-IgG und antigenspezifischen IgG unterschieden. Als Antigen sind mBSA und die Bestandteile der Knorpelmatrix Kollagen Typ I / II bzw. Proteoglykane anzusehen. Es ist festzustellen, dass die Mengen an Gesamt-IgG und dem Isotyp IgG1 in beiden Gruppen keine Unterschiede aufweisen. Die beiden Isotypen IgG2a und 2b



sind hingegen mBSA-spezifisch bei der sympathektomierten Gruppe signifikant verringert (Abb. 19 B). Diese beiden IgG-Subklassen werden vom Typ 1 der T-Helfer-Lymphozyten bestimmt. Eine abgeschwächte humorale Immunantwort bei den denervierten Tieren ist demnach möglicherweise über einen Th1-Zell-vermittelten Mechanismus zu erklären. Bei den unspezifischen Immunglobulinen zeigt die Sympathektomie eine Erhöhung von IgG2b und IgG3 an (Abb. 19 A). Die Autoantikörper, d.h. die gegen körpereigenes Kollagen I, II und Proteoglykane gerichteten Antikörper, sind in denervierten Mäusen tendenziell verringert, wobei lediglich Kollagen Typ I Signifikanz aufweist (Abb. 19C).

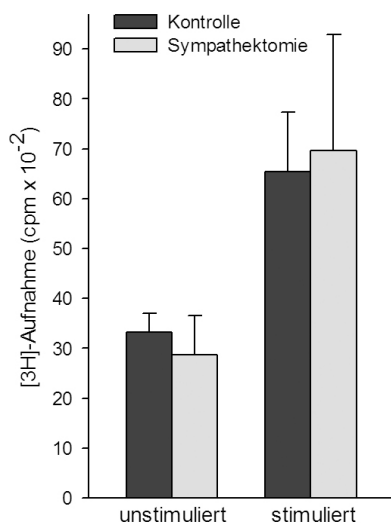


**Abb. 19 Immunglobuline (IgG) im Serum während der akuten Phase der AIA (d3)**  
 Gesamte (A), mBSA-spezifische (B) und gegen die Bestandteile der Knorpelmatrix (K1 Kollagen I, K2 Kollagen II, PG Proteoglykane) (C) gerichtete Immunglobuline vom Tag 3 der AIA. \*  $p < 0,05$

Die **Aktivität der Lymphozyten** ist als weiterer immunologischer Parameter zu sehen. Sie reifen im Thymus heran und differenzieren sich in den sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten) nach Antigenkontakt. Die von ihnen gebildeten Zytokine bestimmen wesentlich die Pathogenese der AIA, indem sie die

zelluläre Kommunikation zwischen T- und B-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und synovialen Fibroblasten ermöglichen.

Ob die Sympathektomie Einfluss auf die Teilungsfähigkeit der Lymphozyten hat, wurde durch den Proliferationsassay mit radioaktiv markiertem Thymidin untersucht. *Ex vivo* wiesen diese Zellen weder unstimuliert noch nach erneutem Antigenkontakt Unterschiede in der Neusynthese von DNA auf (Abb. 20). Die chemische Sympathektomie hat demnach keinen Einfluss auf die zelluläre Proliferation.



**Abb. 20 Proliferationsassay**

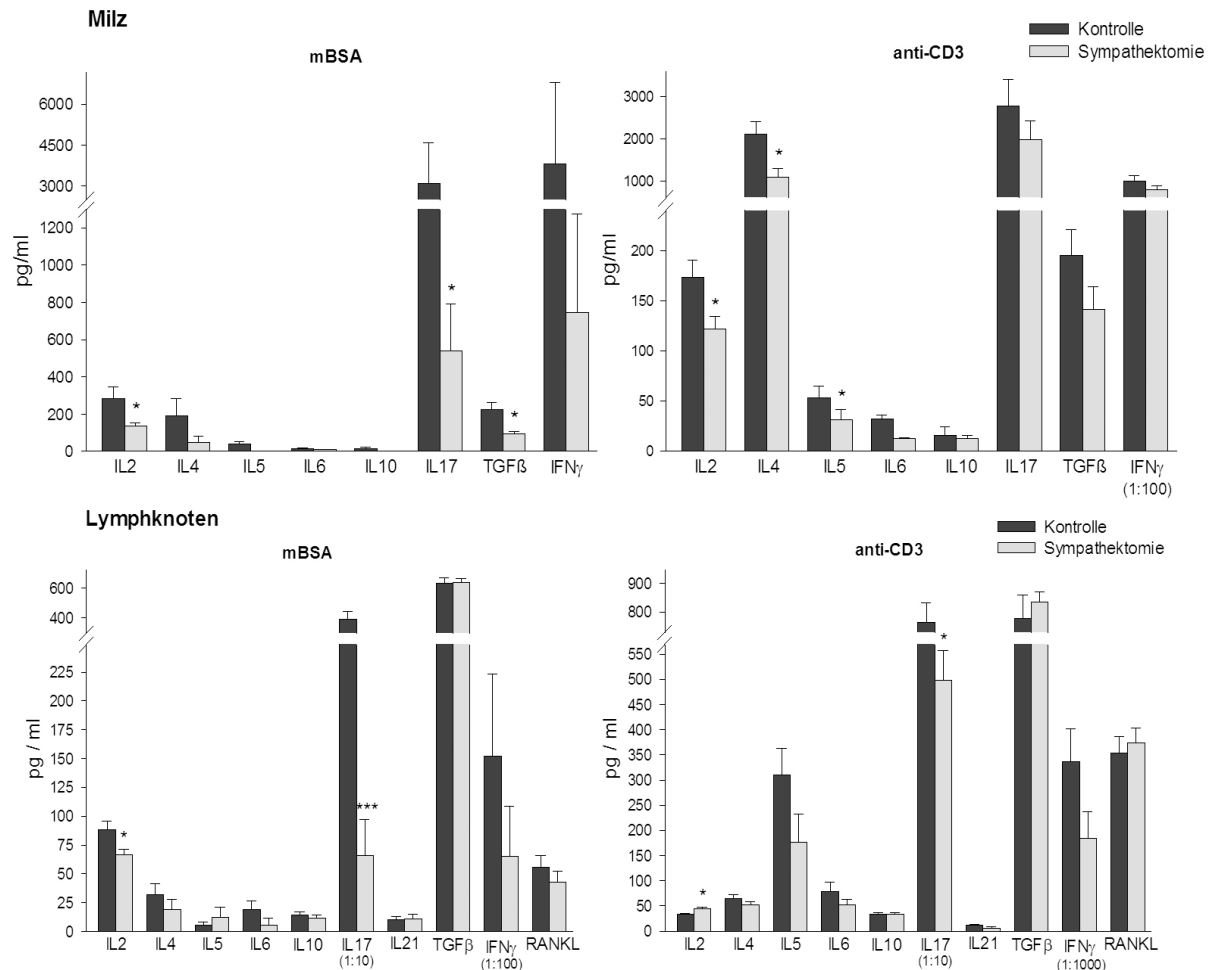
Lymphozyten der Milz wurden aus Tieren am Tag 3 der AIA isoliert und *in vitro* mit 25µg mBSA/ml stimuliert. Gemessen wurde der Einbau von radioaktiv markierten Thymidin in die DNA.

Das **Zytokinprofil** in Überständen von kultivierten Lymphozyten aus der Milz bzw. den Lymphknoten wurde mittels ELISA bestimmt. Hierzu wurden die gewonnenen Zellen antigenspezifisch mit mBSA oder mit immobilisierten anti-CD3-Antikörpern *in vitro* stimuliert und kultiviert. Es ist festzustellen, dass das Spektrum der gemessenen Zytokine stimulationsunabhängig bei Lymphknotenzellen größer ist als bei denen aus der Milz. Interleukin-5 (IL-5), IL-6, IL-10 und IL-21 konnten in Milzzellen nicht bzw. nur sehr schwach gemessen werden.

Vergleicht man lediglich die Zytokinkonzentrationen der Kontrolltiere, ist zu erkennen, dass IL-2 und IL-4 unabhängig von der Stimulation von den Zellen der Lymphknoten weniger produziert werden als in der Milz, während IL-17, IFN $\gamma$  und TGF $\beta$  dort jeweils verstärkt gebildet werden. Ebenso wird IL-17 nach anti-CD3-Stimulation von den T-Zellen der Lymphknoten stärker produziert (Abb. 21).

Des Weiteren ist der Einfluss des Stimulationstyps, unabhängig vom Organ, aus welchem die Lymphozyten entstammen, ersichtlich. So wird IL-2 von Milz- und Lymphknotenzellen bei anti-CD3-Stimulation in geringeren Mengen freigesetzt, IL-4 und IFN $\gamma$  hingegen in erhöhtem Maße im Vergleich zur mBSA-Stimulation. T-Zellen der Lymphknoten bilden zusätzlich mehr IL-5 und IL-17 bei Stimulierung des T-Zell-

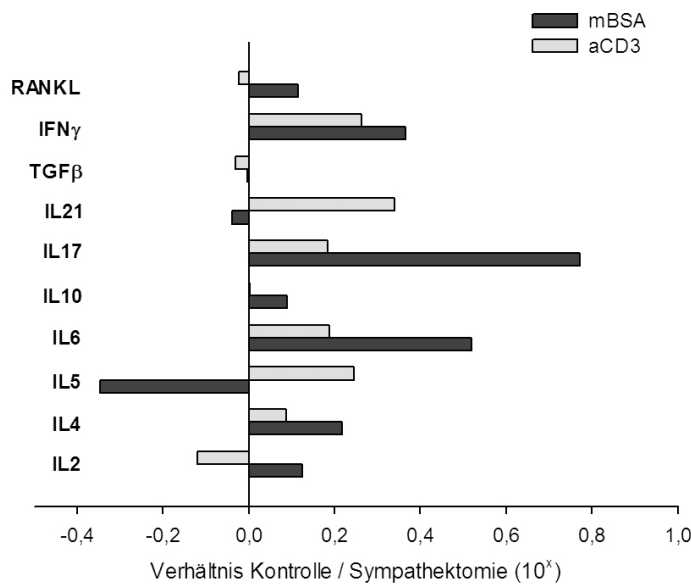
Rezeptors. Die restlichen Zytokine blieben jeweils unverändert oder wurden nur in so geringen Mengen produziert, die für einen objektiven Vergleich unzureichend waren (Abb. 21).



**Abb. 21 Zytokine in Überständen von Milz- und Lymphknotenzellen**

Die Zellen wurden aus den sekundären lymphatischen Organen von sympathektomierten oder Kontrolltieren am Tag 3 der AIA gewonnen und *in vitro* mit mBSA oder anti-CD3 restimuliert. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Die Rolle des Sympathikus auf die Menge der freigesetzten Zytokine erkennt man am deutlichsten, wenn die Werte der unbehandelten AIA-Kontrolltiere mit denen der sympathektomierten Tiere ins Verhältnis gesetzt werden (Abb. 22). Positive Zahlen auf der Abszisse geben dabei eine Verschiebung des Mengenverhältnisses in Richtung Kontrolltiere an, negative in Richtung Sympathektomie. Unabhängig vom Stimulationstyp ist hier bei fast allen Zytokinen ein hemmender Einfluss der sympathischen Denervation erkennbar. Lediglich IL-2 und IL-5 zeigen bei jeweils einem Stimulationstyp eine Verschiebung der Mengenverhältnisse in Richtung Sympathektomie.



**Abb. 22 Einfluss der Sympathektomie auf das Zytokinprofil von Lymphozyten (d3)**

Verhältnis der von T-Zellen aus Lymphknoten produzierten Zytokine am Tag 3 der AIA bei unterschiedlicher Stimulierung.

Verglichen wurden sympathektomierte Tiere und AIA-Kontrollen.

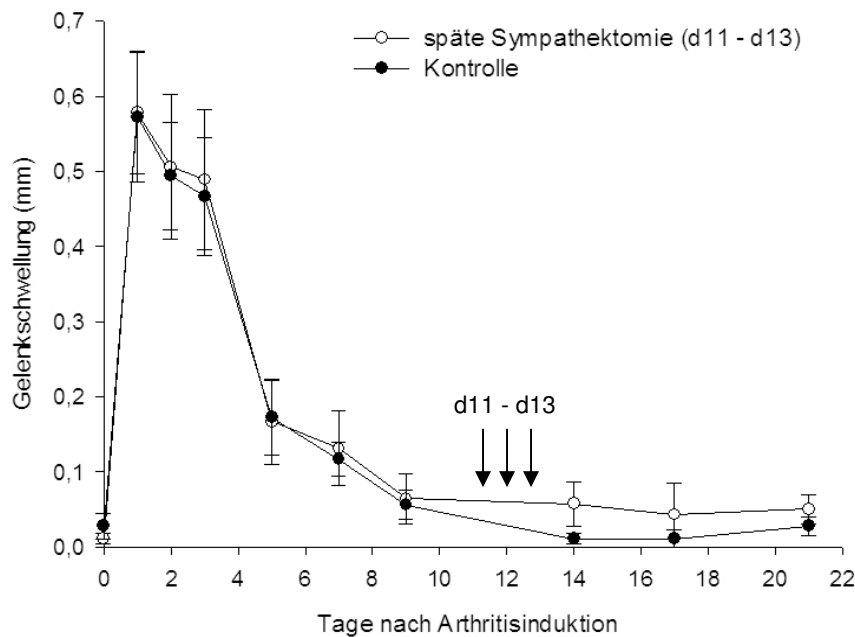
Hervorzuheben ist die sehr starke Veränderung der gebildeten Mengen an IL-6, IL-17 und IFN $\gamma$ . Diese drei Zytokine, welche maßgeblich den Verlauf der AIA beeinflussen können<sup>66</sup>, werden durch die Sympathektomie in ihrer Menge deutlich reduziert. IL-17 trägt über Aktivierung der synovialen Fibroblasten sowie Förderung der Osteoklastogenese und Chemotaxis für neutrophile Granulozyten entscheidend zur Gelenkzerstörung bei. Diesem pro-inflammatorischen Charakter steht die auf die IL-17-Produktion bezogene hemmende Eigenschaft des IFN $\gamma$  gegenüber. Ebenso wird das die Th17-Differenzierung begünstigende Zytokin IL-6 in sympathektomierten Tieren vermindert gebildet.

Die vornehmlich durch die T<sub>reg</sub>-Subpopulation freigesetzten regulatorisch wirkenden Zytokine IL-10 und TGF $\beta$  werden ebenso wie RANKL, welches zur Osteoklastenaktivierung beiträgt, durch die Denervation in der akuten Phase der AIA kaum beeinflusst. Auch lässt sich keine generelle Aussage über den Einfluss des Sympathikus auf die Zytokine der klassischen Th1/Th2-Einteilung treffen, da sowohl das pro-inflammatorische IL-2 (Th1) als auch das anti-inflammatorische IL-5 (Th2) je nach Stimulationstyp in Folge der Denervation vermindert oder verstärkt synthetisiert werden.

### 3.2.3 Sympathektomie in der chronischen Phase der AIA

Nachdem der Einfluss der chemischen Sympathektomie auf die akute Phase der AIA beschrieben wurde, sollte im Folgenden die chronische Entzündungsphase charakterisiert werden. Diese beginnt am Tag 7 nach Applikation des Antigens und zeichnet sich durch ein fast vollständiges Abklingen der Gelenkschwellung aus. In diesem Versuch wurden die Tiere an den Tagen 11 – 13 nach Auslösen der AIA chemisch sympathektomiert und die Werte der Gelenkschwellung weiter

dokumentiert (Abb. 23). Hierbei war keine Einflussnahme der Sympathektomie zu erkennen. Die Schwellungswerte glichen denen der unbehandelten AIA-Kontrollgruppe und zeigten bis zum Tag 21 keine Änderung im Arthritis-Verlauf. Das gleiche Ergebnis wurde auch für die Sympathektomie zu einem früheren Zeitpunkt der chronischen Phase (Tag 8-10) erzielt (Abb. 49 im Anhang). Dieses Resultat stellt einen klaren Unterschied zum Modell der Kollagen-induzierten Arthritis dar, bei dem ein deutlich pro-inflammatorischer Effekt durch die Sympathektomie in der chronischen Phase induziert wurde<sup>58</sup>.



**Abb. 23 Einfluss der Sympathektomie auf die chronische Phase der AIA**  
Die Tiere wurden in der chronischen Entzündungsphase an den Tagen 11, 12 und 13 (Pfeile) nach Auslösen der AIA mit 6-OHDA sympathektomiert.

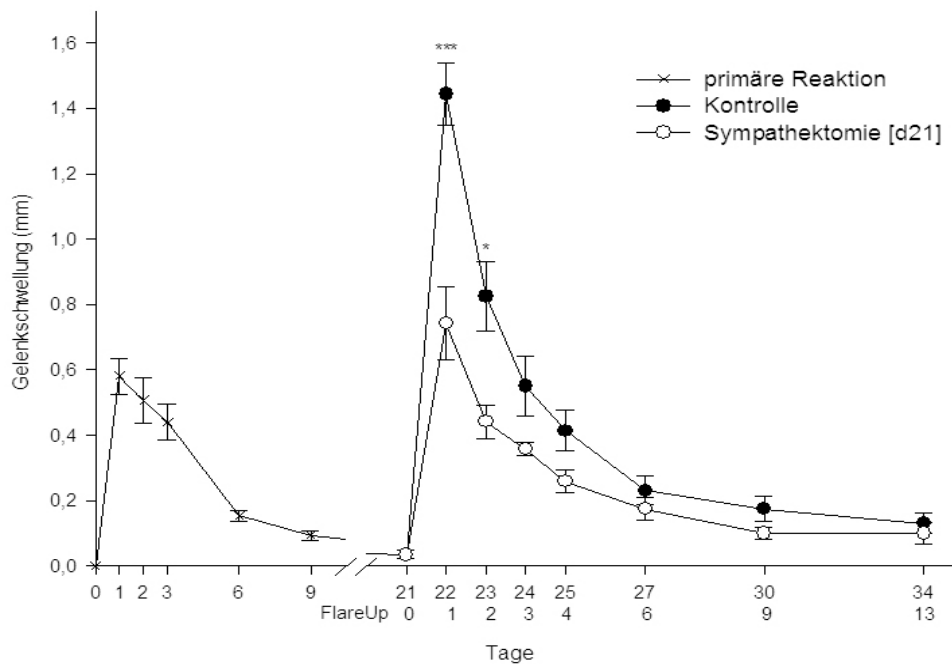
### 3.2.4 Sympathektomie und Flare-up-Reaktion (d21)

Im AIA-Modell führt die erneute intraartikuläre Gabe des Antigens, 3 Wochen nach dem primären Auslösen, zu einer weiteren akuten Entzündungsreaktion. Dieser Flare-up überlagert die bestehende chronische Entzündung und ähnelt den akuten Schüben der rheumatoiden Arthritis.

Um den Einfluss des Sympathikus auf diese Flare-up-Reaktion zu bestimmen, wurde das Neurotoxin 6-OHDA gemäß dem Schema der primären Entzündungsreaktion zum Zeitpunkt des zweiten Auslösens appliziert. Die unbehandelten Kontrollen zeigten dabei eine akute Entzündungsreaktion mit Gelenkschwellungswerten, die mehr als dem Doppelten der Primärreaktion

entsprachen. Die chemische Sympathektomie konnte jedoch auch hier die Höhe der Schwellung an den ersten Tagen im Mittel um ~45% reduzieren (Abb. 24).

Erst mit Abklingen des akuten Schubes zum Übergang in die chronische Phase am Tag 6 glichen sich die Werte der beiden Versuchsgruppen wieder einander an. Dies entspricht der gleichen Wirksamkeit wie bei der primären akuten Entzündung (Reduktion der Schwellung an d1 – d3 im Mittel von ~50%) (vgl. Abb. 17 A).



**Abb. 24 Einfluss der Sympathektomie auf die Flare-up-Reaktion der AIA**

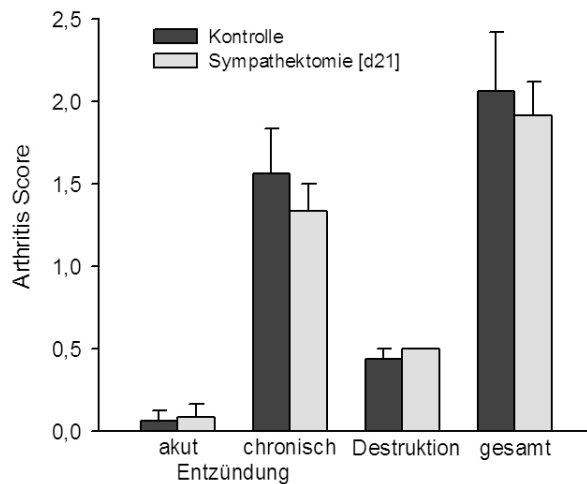
Am Tag 21 der primären Entzündungsreaktion wurde durch erneute intra-artikuläre mBSA-Applikation eine Flare-up-Reaktion ausgelöst. Gleichzeitig erfolgte die chemische Sympathektomie mit 6-OHDA an den Tagen 20 – 22.

\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Da diese Reaktion die zweite akute Phase im AIA-Verlauf darstellt und die bestehende chronische Entzündung überlagert, zeigen sich im histologischen Bild vom Tag 13 der Flare-up-Reaktion keine Unterschiede zwischen den Gruppen mehr. Die Parameter der chronischen Entzündung und der Destruktion weisen in etwa gleiche Werte auf (Abb. 25). Im Gegensatz zur histologischen Bewertung der primären akuten Phase am Tag 3 hat die Sympathektomie zu diesem Zeitpunkt keinen Einfluss mehr auf das Entzündungsgeschehen (vgl. Abb. 17 B).

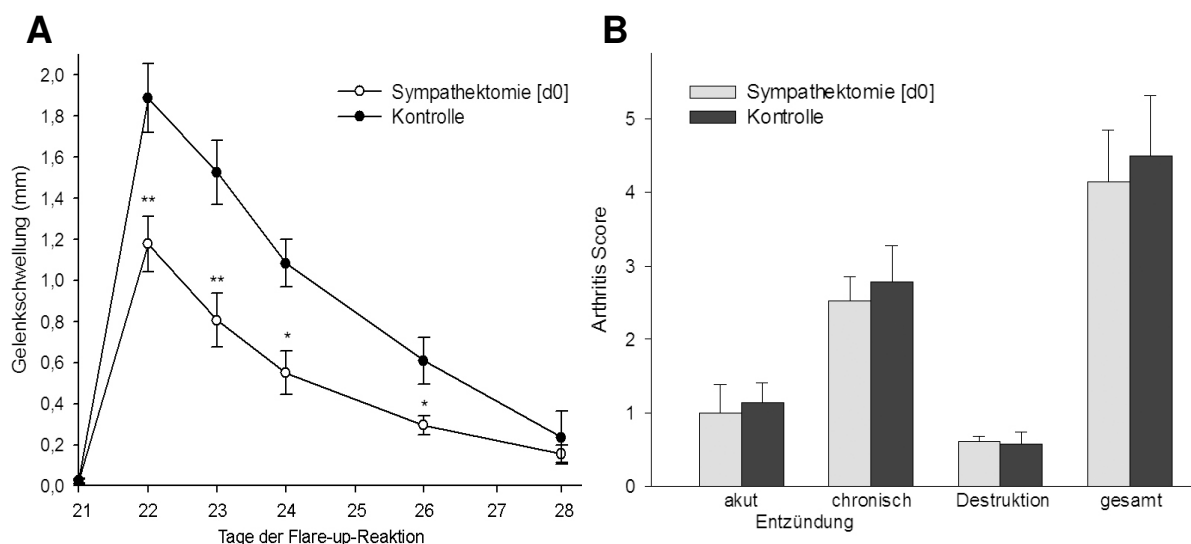
Wird eine Flare-up-Reaktion nach dem gleichen Schema bei zuvor in der Primärreaktion sympathektomierten (d-1 – d1) Tieren ausgelöst, so stellt sich der gleiche Effekt ein wie zuvor beschrieben. Die 21 Tage zurückliegende Sympathektomie reduziert die Gelenkschwellung um ~43%, zeigt jedoch ebenfalls keine Einfluss-

nahme auf die Entzündungsparameter im histologischen Bild zum Ende der akuten Phase am Tag 7 des Flare-up (Abb. 26).



**Abb. 25 Histologische Bewertung der Flare-up-Reaktion am Tag 34 (d13 Flare-up)**

Die Flare-up-Reaktion wurde am Tag 21 ausgelöst. Die Sympathektomie erfolgte an den Tagen 20 – 22.



**Abb. 26 Einfluss der primären Sympathektomie auf die Flare-up-Reaktion**

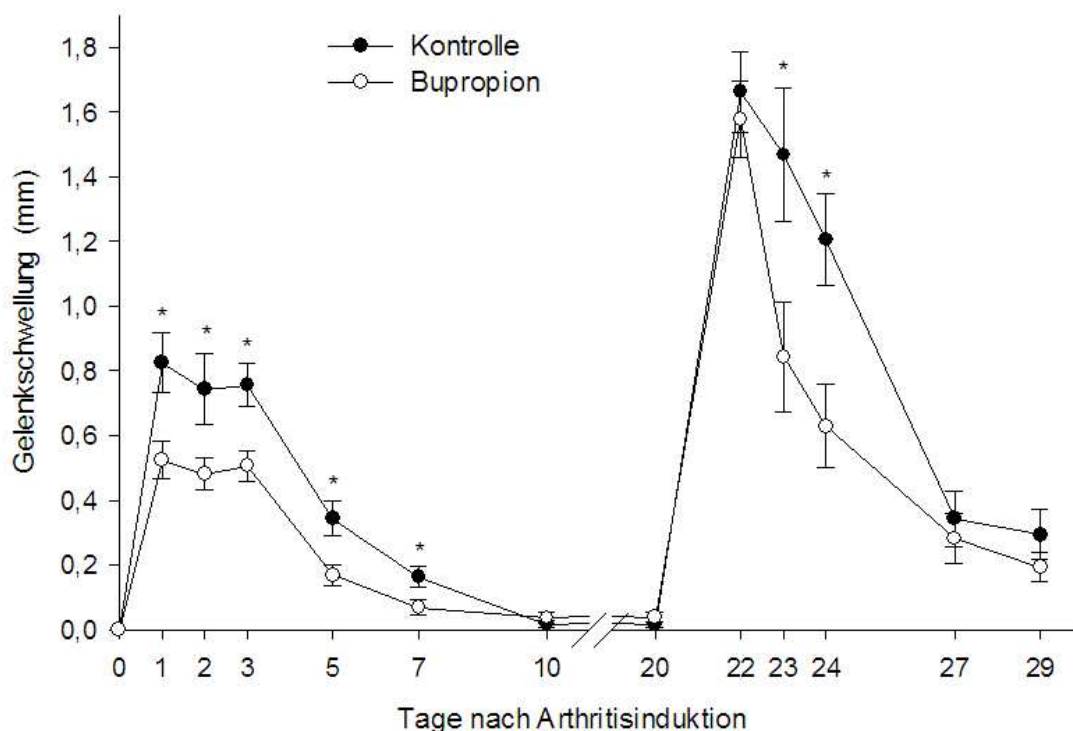
Zu Beginn der primären Entzündungsreaktion wurden die Versuchstiere am Tag 0 (d-1 – d1) sympathektomiert. Die Flare-up-Reaktion wurde am Tag 21 ausgelöst. Die Gelenkschwellung wurde während der Flare-up-Reaktion gemessen (**A**) und das histologische Bild der Entzündung am Tag 28 (d7 Flare-up) bewertet (**B**).  
\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Auswirkungen der Sympathektomie am Tag -21 und der Langzeitsympathektomie (vgl. 3.2.1). Bei diesen Untersuchungen bezüglich des effektivsten Zeitpunktes der Denervation konnte keine Wirkung des Neurotoxins auf die Gelenkschwellung festgestellt werden. Weder die Sympathektomie vor der ersten Immunisierung (d-21) noch die 6-wöchige ab dem

Tag -42 konnte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen das Maß der Schwellung beeinflussen. Dies bekräftigt die zuvor gewonnene Erkenntnis, dass die Sympathektomie zum Zeitpunkt des Auslösens der AIA erfolgen muss. Die Dauer der Wirksamkeit der Denervation, bezogen auf die Reduktion der Gelenkschwellung, liegt infolge dessen bei mindestens 3 Wochen.

### 3.2.5 Einfluss von Bupropion auf die Gelenkschwellung

Der selektive Noradrenalin-/Dopamin-Wiederaufnahmehemmer (NDRI) Bupropion zeigt neben seiner ursprünglichen Verwendung als Antidepressiva auch anti-inflammatorische Eigenschaften in einem murinen Entzündungsmodell<sup>25</sup>. Er hemmt die Wiederaufnahme der Catecholamine Noradrenalin und Dopamin an der prä-synaptischen Membran und weist dadurch den gleichen Wirkungsort wie 6-Hydroxydopamin auf. Appliziert man den immunisierten Tieren diesen Wirkstoff zum Zeitpunkt des Auslösens der AIA (50 mg/kg i.p. an den Tagen -1, 0 und 1), so ist eine signifikant geringere Gelenkschwellung gegenüber den AIA-Kontrollen in der akuten Phase zu messen (Abb. 27). Mit Beginn der chronischen Phase gleichen sich die Werte zwischen den Versuchsgruppen wieder an.



**Abb. 27 Einfluss von Bupropion auf den Verlauf der AIA**

Den Tieren wurde an den Tagen -1, 0 und 1 sowie 20, 21 und 22 der NDRI (selektiver Noradrenalin-/ Dopamin-Wiederaufnahmehemmer) Bupropion (50 mg/kg) i.p. appliziert. Die AIA wurde an den Tagen 0 und 21 (Flare-up) ausgelöst. \*  $p < 0,05$



Ebenso wird die akute Entzündung der Flare-up-Reaktion (ausgelöst am Tag 21) durch die Gabe von Bupropion (Tag 20, 21, 22) abgeschwächt. Dieses Ergebnis entspricht der Wirkung der chemischen Sympathektomie und bestätigt damit die Wirkungsweise des 6-Hydroxydopamins.

### 3.2.6 Zusammenfassung

Zunächst galt es, den effektivsten Zeitpunkt und die Konzentration von 6-OHDA für die Sympathektomie zu bestimmen. Eine Dosis von 150 mg/kg Körpergewicht i.p., appliziert zum Zeitpunkt des Auslösens der AIA, stellte sich dabei als wirksamstes Schema heraus. Wie auch bei der neonatalen Sympathektomie wurde hier die Gelenkschwellung am deutlichsten reduziert. Die Denervation während der Immunisierungsphase und eine Langzeitsympathektomie zeigten ebenso wie die intraartikuläre Gabe des Neurotoxins keine entzündungssenkende Wirkung.

Da sich die Einflussnahme der Sympathektomie besonders auf die akute Phase der AIA konzentriert, wurde diese genauer charakterisiert. Die Schwere der Gelenkschwellung konnte hierbei um ~50% vermindert werden. Erst ab Tag 7 glichen sich die Werte der unbehandelten Kontrollgruppe wieder an. Ebenso zeigten die sympathektomierten Tiere im histologischen Bild eine geringere Infiltration von Immunzellen ins Kniegelenk sowie eine schwächere synoviale Hyperplasie. Bei der Messung der Antikörper-Titer im Serum konnten infolge der Sympathektomie signifikant geringere Mengen an mBSA-spezifischem IgG2a und IgG2b nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu diesen Th1-vermittelten IgG-Subklassen zeigten die Messwerte für Gesamt-IgG, IgG1 und IgG3 keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die Antikörper gegen Kollagen I und II sowie gegen Proteoglykane wurden in den sympathektomierten Tieren tendenziell in geringerem Maße produziert.

Des Weiteren wurde die Aktivität der Lymphozyten untersucht. Mittels Proliferationsassay konnten dabei nach Denervation keine Unterschiede bezüglich ihrer Teilungsfähigkeit festgestellt werden. Im Zytokinprofil ist ein umfassender hemmender Einfluss der Sympathektomie festzustellen. Besonders die Mengen des pro-inflammatorischen IL-17 und des regulatorisch wirkenden IFN $\gamma$  werden signifikant verringert. Diesen beiden Zytokinen wird die Funktion zugesprochen, den Verlauf der AIA maßgeblich beeinflussen zu können<sup>66</sup>.

Im Gegensatz zur akuten Entzündungsphase konnte in der chronischen Phase kein Einfluss des Sympathikus nachgewiesen werden. Die Denervation an den Tagen 11-13 nach Auslösen der AIA veränderte den Verlauf der Gelenkschwellung bis zum Tag 21 nicht. Dies stellt einen wesentlichen Unterschied zum Modell der

Kollagen-induzierten Arthritis dar, bei dem eine pro-inflammatorische Wirkung der Sympathektomie bei der chronischen Arthritis aufgezeigt wurde<sup>58</sup>.

Der Einfluss des Sympathikus wurde zudem in der Flare-up-Reaktion untersucht. Die nach erneutem Antigen-Kontakt induzierte akute Entzündungsreaktion ähnelt den akuten Schüben der rheumatoiden Arthritis. Auch hier konnte eine Minderung der Gelenkschwellung als Folge der chemischen Sympathektomie nachgewiesen werden. Im histologischen Bild sind diese Veränderungen durch das Überlagern mit der bestehenden chronischen Phase nicht zu erkennen.

Die Bestätigung der Wirkungsweise von Hydroxydopamin konnte durch Bupropion erbracht werden. Dieser selektive Noradrenalin-/Dopamin-Wiederaufnahmehemmer wirkt entsprechend dem 6-OHDA ebenfalls an der präsynaptischen Membran und vermindert die Werte der Gelenkschwellung in der akuten Entzündungsphase signifikant.

### **3.3 Nozizeptives Verhalten im Verlauf der AIA**

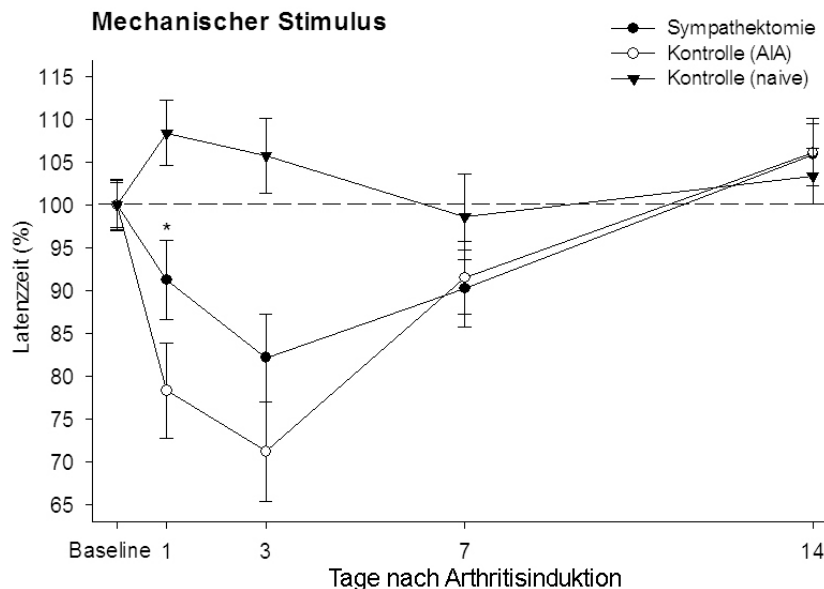
Das nozizeptive Verhalten im Verlauf der AIA wurde über mechanische und thermische Reize an der Fußsohle untersucht. Dabei ziehen die Mäuse ihre Pfote als Reaktion auf einen noxischen Reiz ab einer bestimmten nozizeptiven Schwelle zurück. Die Abnahme dieser Schwelle wird in Tiermodellen als Hyperalgesie bezeichnet und kann als Latenzzeit an der arthritischen Extremität gemessen werden. Die erhöhte Schmerzempfindlichkeit des betroffenen Gelenks ist somit durch ein schnelleres Zurückziehen der Pfote charakterisiert.

#### **3.3.1 Mechanische Hyperalgesie**

Im Folgenden wurde das nozizeptive Verhalten auf mechanische Reize bei der Arthritis untersucht. Mit einem Dynamic Plantar Aesthesiometer wird hierbei Druck auf die Fußsohle der Pfote an der arthritischen Extremität ausgeübt und anhand der gemessenen Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote die sekundäre Hyperalgesie bestimmt. Im Verlauf der AIA wurde dabei der Einfluss der chemischen Sympathektomie ermittelt.

Während der akuten Phase der AIA zeigen die Kontrolltiere eine ausgeprägte Hyperalgesie mit einer Verringerung der Latenzzeit um ~30%. Diese fällt zum Ende der akuten Phase am Tag 7 wieder ab. In der chronischen Entzündungsphase liegt das Level der Schmerzempfindlichkeit wieder auf dem Niveau der Baseline. Einen ähnlichen Verlauf, jedoch mit signifikant geringerer Intensität, zeigen die sympathektomierten AIA-Tiere. Die Denervation führt somit in der akuten Phase zu einer abgeschwächten Hyperalgesie. Die nozizeptive Schwelle, die Pfote als

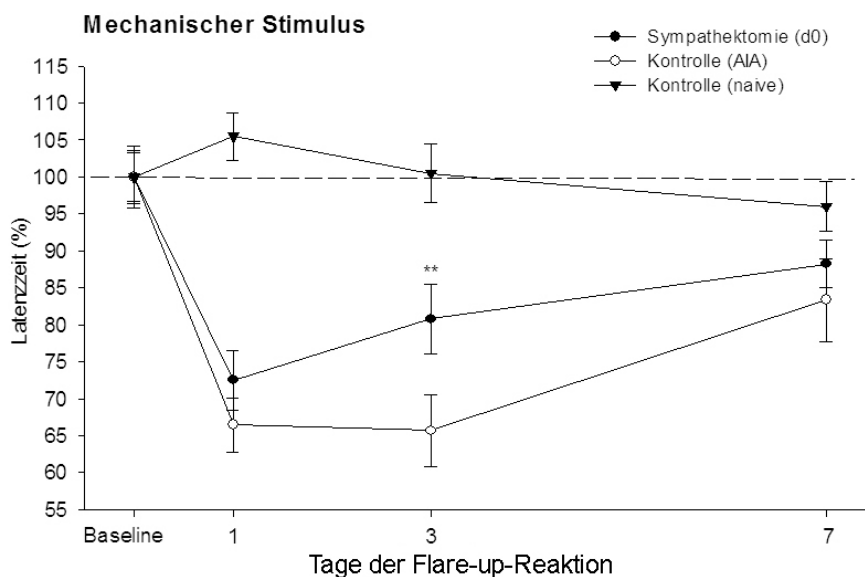
Antwort auf einen noxischen Reiz zurückzuziehen, wird demnach erhöht. Die als Kontrolle der Testung mitgeführten naiven Tiere zeigen an den kurz aufeinander folgenden Tagen 1 und 3 jeweils eine leicht abgesenkte Schmerzempfindlichkeit. Die Latenzzeit ist hierbei geringfügig erhöht. Dies liegt in einer gewissen Toleranz gegenüber dem mechanischen Reiz begründet (Abb. 28).



**Abb. 28 Mechanische Hyperalgesie im Verlauf der AIA**

Während naive Tiere keine Hyperalgesie zeigen, kommt es in der akuten Phase der AIA zu einer deutlich erhöhten Schmerzempfindlichkeit. Diese wird durch die Sympathektomie signifikant gemildert. (naive Kontrolle 100% = 4,6 Sek.; AIA-Kontrolle 100% = 4,6 Sek.; Sympathektomie 100% = 4,5 Sek.) \*  $p < 0,05$  zwischen den Gruppen Sympathektomie und Kontrolle (AIA).

Ebenso wurde das Schmerzverhalten in der akuten Phase der Flare-up-Reaktion gemessen. Die AIA wurde hierbei am Tag 28 zum zweiten Mal ausgelöst. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte ebenfalls die chemische Sympathektomie. Die naiven Kontrolltiere zeigen mit einer verminderten Schmerzempfindlichkeit den gleichen Verlauf wie bereits oben beschrieben. Die AIA-Kontrollen und die sympathektomierten Tiere weisen im Vergleich zur primären akuten Phase eine stärkere Hyperalgesie auf, wobei auch wieder die Tendenz zu einem milderem Verlauf im Fall der sympathischen Denervation zu erkennen ist. Mit ~35% Verringerung der Latenzzeit am Tag 3 des Flare-up weisen die unbehandelten arthritischen Tiere ein Maximum an Hyperalgesie auf. Entsprechend dem stärkeren Grad der Schmerzempfindlichkeit klingt die Hyperalgesie bis zum Beginn der chronischen Phase (Tag 7) auch in geringerem Maße wieder ab (Abb. 29).



**Abb. 29 Mechanische Hyperalgesie in der Flare-up-Reaktion**

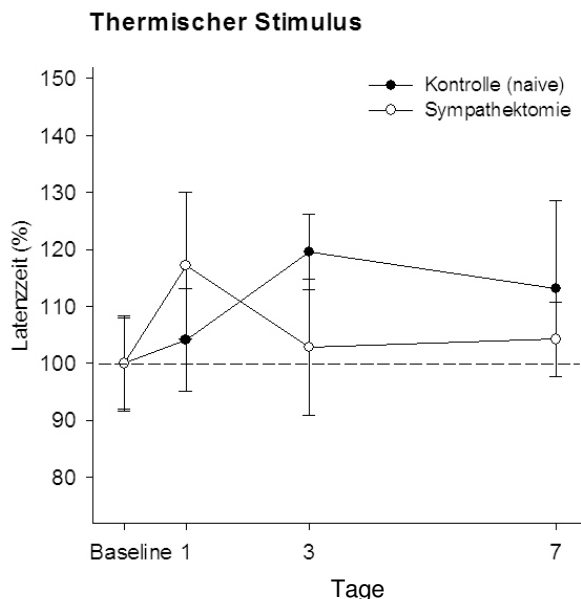
Die arthritischen Tiere zeigen im Vergleich zur primären akuten Phase eine stärkere Hyperalgesie. Die Tendenz zu einem milderem Verlauf infolge der Sympathektomie ist auch hier erkennbar.

(naive Kontrolle 100% = 4,7 Sek.; AIA-Kontrolle 100% = 5,2 Sek.; Sympathektomie 100% = 4,6 Sek.) \*\*  $p < 0,01$  zwischen den Gruppen Sympathektomie und Kontrolle (AIA).

### 3.3.2 Thermische Hyperalgesie

Neben dem Druck als mechanischer Reiz wurde in ähnlicher Weise über Infrarotlicht vermittelte Hitze als thermischer Stimulus für die Untersuchung des Schmerzverhaltens verwendet. Das Anheben der Pfote als Reaktion auf den noxischen Reiz wurde auch hier als Latenzzeit und damit Maß für die sekundäre Hyperalgesie gewertet.

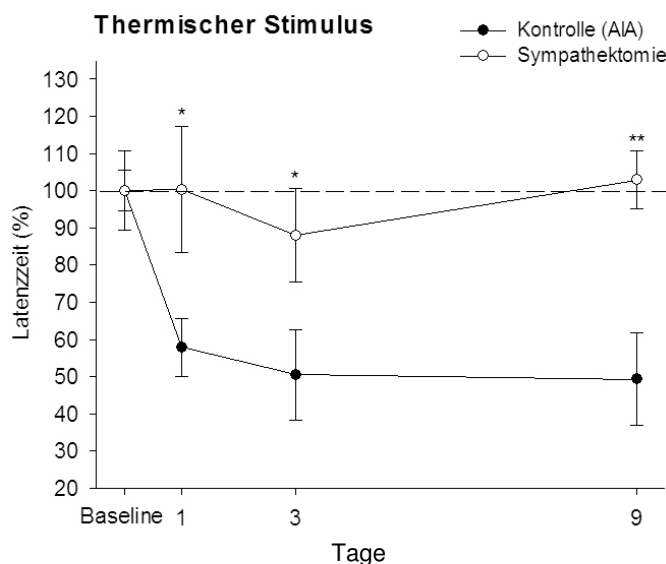
Gesunde Kontrolltiere zeigen dabei ebenso wie sympathektomierte nicht-arthritische Tiere keine erhöhte Schmerzempfindlichkeit (Abb. 30). Eine geringe Toleranz gegenüber dem thermischen Stimulus ist wie bei der mechanischen Testung erkennbar. Im Verlauf der AIA nimmt die Latenzzeit deutlich um ~50% ab. Dieser Wert bleibt ab Tag 3 der akuten Phase bis in die chronische Phase bestehen. Durch die chemische Sympathektomie wird diese Hyperalgesie signifikant verringert und zeigt am Tag 3 ein Maximum von lediglich ~10%. Mit Beginn der chronischen Phase entspricht die Latenzzeit hierbei wieder dem Niveau der Baseline (Abb. 31). Die lang anhaltende erhöhte Empfindlichkeit der AIA-Tiere gegenüber dem thermischen Reiz stellt somit den wesentlichen Unterschied im Vergleich zur Untersuchung der mechanischen Hyperalgesie dar.



**Abb. 30 Thermischer Stimulus bei nicht-arthritischen Tieren**

Weder bei unbehandelten (naiven) noch bei sympathektomierten Kontrolltieren ist eine Hyperalgesie auf thermische Reize erkennbar. Eine geringe Toleranz auf den Stimulus entwickelt sich in beiden Gruppen.

(Kontrolle 100% = 6,2 Sek.; Sympathektomie 100% = 5,8 Sek.)



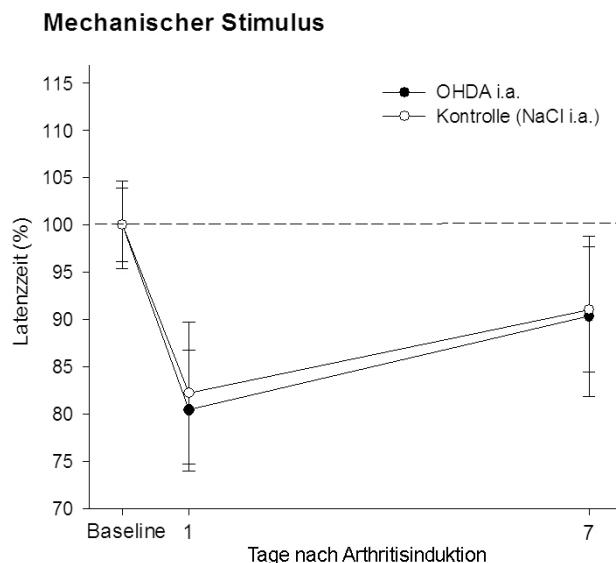
**Abb. 31 Thermische Hyperalgesie im Verlauf der AIA**

Die AIA-Kontrolltiere zeigen eine ausgeprägte Hyperalgesie bis in die chronische Phase. Die Sympathektomie mildert diesen Effekt deutlich ab. (Kontrolle 100% = 5,1 Sek.; Sympathektomie 100% = 4,3 Sek.)

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

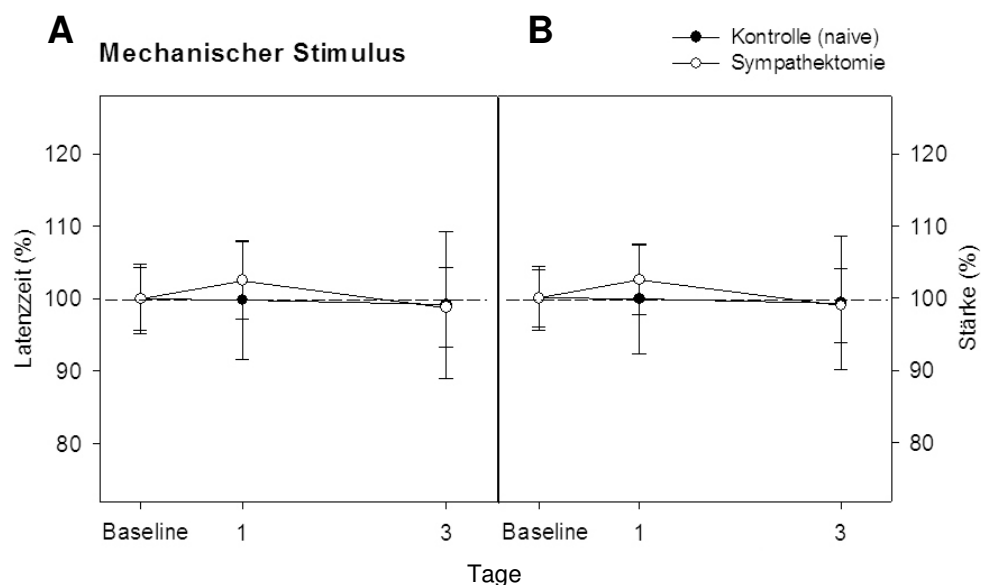
### 3.3.3 Relevanz des Sympathektomie-Schemas im nozizeptiven Verhalten

Hierbei sollte zur Kontrolle gezeigt werden, dass das zuvor beschriebene etablierte Schema der systemischen Sympathektomie für das schmerzabhängige Verhalten relevant ist. Wird das Neurotoxin 6-OHDA intraartikulär in das arthritische Gelenk anstatt intraperitoneal appliziert, so ist kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festzustellen (Abb. 32). Die Latenzzeit, als Maß der Hyperalgesie, verringert sich jeweils um ~20% in der akuten Phase der AIA. Mit Eintritt in die chronische Phase nähert sich der Wert der Pfoten-Rückzugsschwelle wieder dem Ausgangswert vor Auslösen der AIA (Baseline) an.



**Abb. 32 Schmerzabhängiges Verhalten im Verlauf der AIA**  
Versuchstiere zeigen in der akuten Phase der AIA eine ausgeprägte sekundäre mechanische Hyperalgesie. Die intraartikuläre Gabe von 6-OHDA (OHDA i.a.) vor dem Auslösen nimmt auf dieses Verhalten keinen Einfluss. Latenzzeit als Prozentsatz der Baseline. (OHDA 100% = 4,5 Sek.; Kontrolle 100% = 4,7 Sek.)

Inwieweit die chemische Sympathektomie an sich Einfluss auf das nozizeptive Verhalten nimmt, wurde an naiven Tieren ohne Entzündungsreaktion getestet. Ähnlich dem AIA-Verlauf wurden die gesunden Mäuse wenige Tage nach erfolgter Sympathektomie auf ihr schmerzabhängiges Verhalten hin untersucht. Dabei zeigten sich weder bei der Latenzzeit (Abb. 33 A) noch bei dem Wert der Reizstärke (Abb. 33 B) Unterschiede zwischen naiven und sympathektomierten Tieren.



**Abb. 33 Sympathischer Einfluss auf die Hyperalgesie in naiven Tieren.** Nicht-arthritische Versuchstiere zeigen keine erhöhte Schmerzempfindlichkeit, die durch eine Sympathektomie beeinflusst werden kann. Weder Latenzzeit (A) noch Stärke der mechanischen Reizung (B) variieren nach mehrmaliger Testung. (Kontrolle 100% = 5,1 Sek. bzw. 5,3 g; Sympathektomie 100% = 5,9 Sek. bzw. 6,0 g)

Ohne induzierte Entzündungsreaktion nimmt die sympathische Denervation demnach keinen Einfluss auf das Schmerzverhalten und die nozizeptive Schwelle bleibt unverändert.

### **3.3.4 Zusammenfassung**

Das nozizeptive Verhalten der Versuchstiere wurde im Verlauf der AIA mit Hilfe mechanischer und thermischer Stimuli getestet. Die arthritischen Tiere zeigten dabei eine erhöhte Schmerzempfindlichkeit, die als verringerte Latenzzeit auf 30 % (mechanisch) bis 50 % (thermisch) messbar ist. Dieser Effekt wird durch die chemische Sympathektomie in der akuten Entzündungsphase signifikant gemildert, was einer geringeren sekundären Hyperalgesie entspricht. Ab dem Tag 7 im AIA-Verlauf gleichen sich beim mechanischen Stimulus die gemessenen Werte innerhalb der Versuchsgruppen wieder an. Die thermische Hyperalgesie hingegen bleibt bei den Kontrolltieren länger, bis in die chronische Phase hinein bestehen. Bei dem Flare-up tritt im Vergleich zur primären Entzündungsreaktion eine stärkere Schmerzempfindlichkeit auf, jedoch wird auch hier die Hyperalgesie durch die chemische Sympathektomie gedämpft.

### 3.4 Agonisten und Antagonisten der Adrenozeptoren

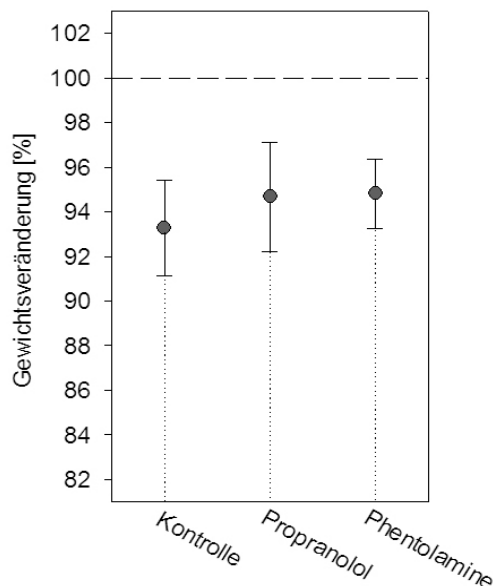
Der postganglionäre Transmitter des sympathischen Nervensystems ist Noradrenalin. Dessen Rezeptoren, die Adrenozeptoren, unterteilen sich in die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Familie, wobei letztere die Subtypen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  einschließt. Verschiedene pharmakologische Substanzen können auf diese Bindungsstellen Einfluss nehmen. Während Agonisten die Wirkung des Botenstoffs imitieren, hemmen die Antagonisten durch Blockieren des Rezeptors den Sympathikus.

#### 3.4.1 Wirkung von Adrenozeptor-Antagonisten auf die AIA

Zunächst sollte die Signalübertragung des Sympathikus gezielt unterdrückt werden, um deren Auswirkung auf den Verlauf der AIA, verglichen mit dem Effekt der chemischen Sympathektomie durch 6-OHDA, untersuchen zu können. Dafür

wurden folgende Antagonisten eingesetzt, welche den Versuchstieren am Tag 0 zweimalig intraperitoneal appliziert wurden:

- Propranolol –  $\beta$ -spezifisch
- Atenolol –  $\beta_1$ -spezifisch
- Butoxamin –  $\beta_2$ -spezifisch
- Phentolamin –  $\alpha$ -spezifisch



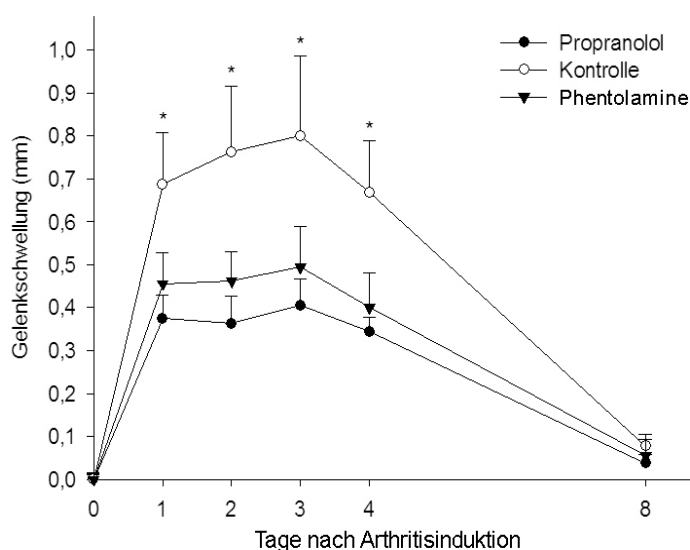
**Abb. 34 Vitalität der Versuchstiere bei der AIA**

Am Tag 2 der AIA zeigten die mit Antagonisten behandelten Tiere keine Gewichtsunterschiede zu der unbehandelten AIA-Kontrolle. Dosis: 2x 10 mg/kg i.p. am Tag 0. Kontrolle 100% (vor AIA) = 19,5 g.

Diese Dosis hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der Mäuse, was die Kontrolle des Körpergewichtes (Abb. 34) und ein allgemein unauffälliges Verhalten belegen. Die Gelenkschwellung konnte in der akuten Phase der AIA sowohl durch  $\alpha$ - als auch durch  $\beta$ -Antagonisten signifikant um ~45% reduziert werden. Dabei zeigte Propranolol als nicht-selektiver  $\beta$ -Blocker eine tendenziell stärkere Wirkung als Phentolamine ( $\alpha$ -Antagonist) (Abb. 35). Mit Beginn der chronischen Phase am Tag 8

waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf die Schwellungswerte mehr erkennbar. Im histologischen Bild konnte ebenfalls kein Einfluss auf das Entzündungsgeschehen am Tag 8 mehr gezeigt werden. Sowohl die Parameter der akuten und chronischen Entzündung als auch die der Destruktion wiesen keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle auf (Abb. 36).

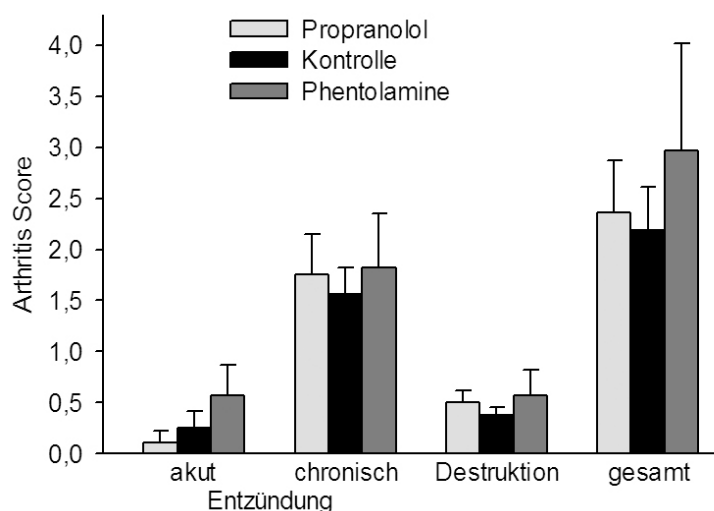




**Abb. 35 Einfluss der Antagonisten auf den Verlauf der AIA**

Propranolol ( $\beta$ ) und Phentolamine ( $\alpha$ ) wurden am Tag 0, 2h vor und 5h nach dem Auslösen der AIA zu je 10 mg/kg intraperitoneal appliziert.

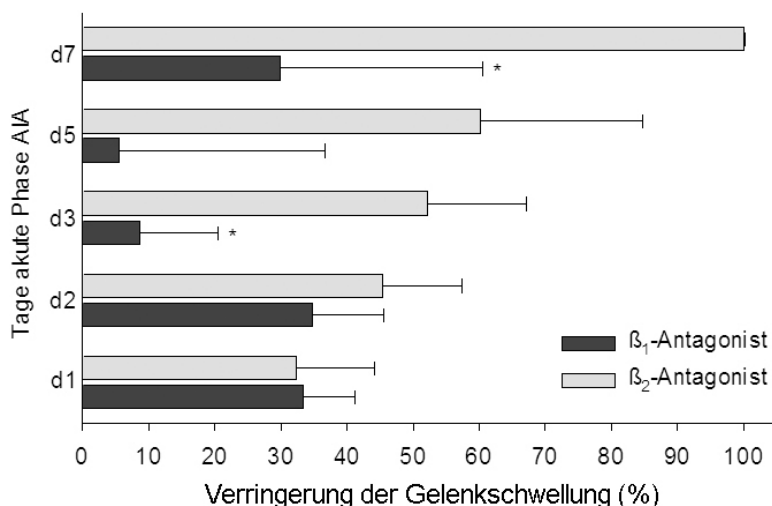
\*  $p < 0,05$  zwischen der Gruppe Kontrolle und beiden Gruppen der Antagonisten.



**Abb. 36 Histologische Bewertung der AIA am Tag 8**

Zu Beginn der chronischen Phase sind keine Unterschiede mehr zwischen den Versuchsgruppen zu erkennen.

Um den tendenziell stärkeren Einfluss der  $\beta$ -Blocker bezogen auf die Gelenkschwellung hin näher zu untersuchen, wurden Adrenozeptor-Antagonisten der beiden Subtypen  $\beta_1$  (Atenolol) und  $\beta_2$  (Butoxamin) verwendet. Im Vergleich zur unbehandelten AIA-Kontrolle weisen Atenolol und Butoxamin an den ersten beiden Tagen der Arthritis keinen Unterschied in ihrer Wirksamkeit auf. Ab dem Tag 3 bis zum Ende der akuten Phase hin ist jedoch das stärkere Potenzial von Butoxamine deutlich zu erkennen. Bezogen auf den Schwellungswert der Kontrolle kann dieser  $\beta_2$ -Antagonist die Gelenkschwellung um 50% (Tag 3) bis 100% (Tag 7) mindern. Dies stellt eine signifikant stärkere Wirkung gegenüber dem Blocker des  $\beta_1$ -Types dar (Abb. 37).

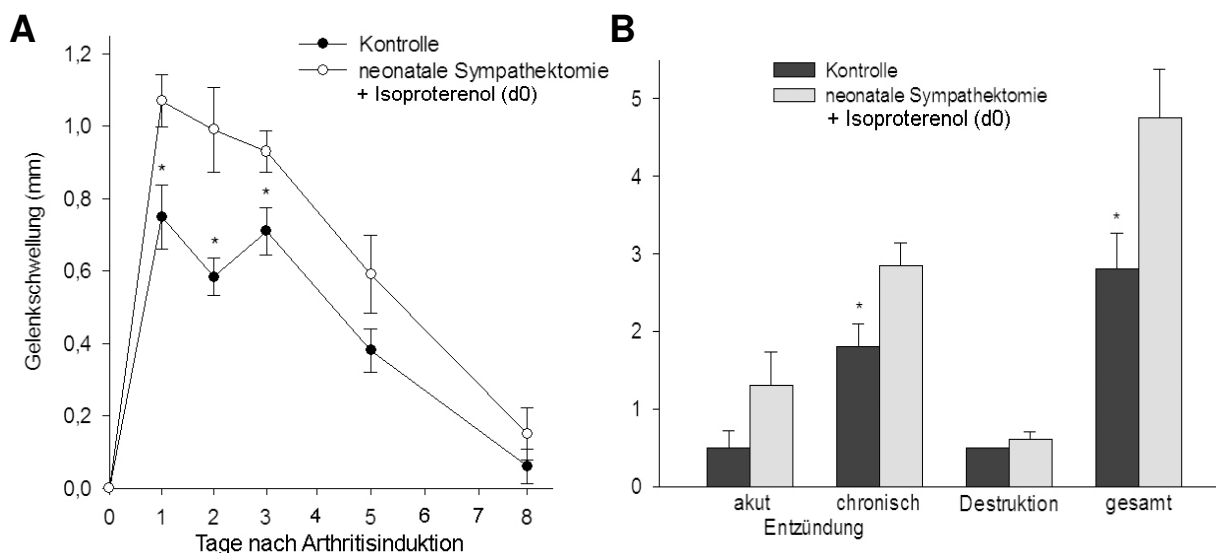


**Abb. 37 Wirksamkeit von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Blockern auf die AIA**

An den Tagen d-1, d0 und d1 wurden je 50 mg/kg Atenolol oder Butoxamine i.p. appliziert. Angegeben ist die prozentuale Verringerung der Schwellung bezogen auf den Wert der Kontrollgruppe. \*  $p < 0,05$ .

### 3.4.2 Zusammenwirken mit der chemischen Sympathektomie

Inwiefern sich der zuvor beschriebene Adrenozeptor-vermittelte Einfluss auf das Entzündungsgeschehen bei der AIA und die Wirkung der chemischen Sympathektomie gegenseitig beeinflussen, sollte im folgenden Experiment untersucht werden. Hierfür wurde der  $\beta$ -Agonist Isoproterenol, welcher die Wirkung des Noradrenalins imitiert, vor dem Auslösen der AIA neonatal sympathektomierten Mäusen verabreicht.



**Abb. 38  $\beta$ -Adrenozeptoragonist und neonatale Sympathektomie**

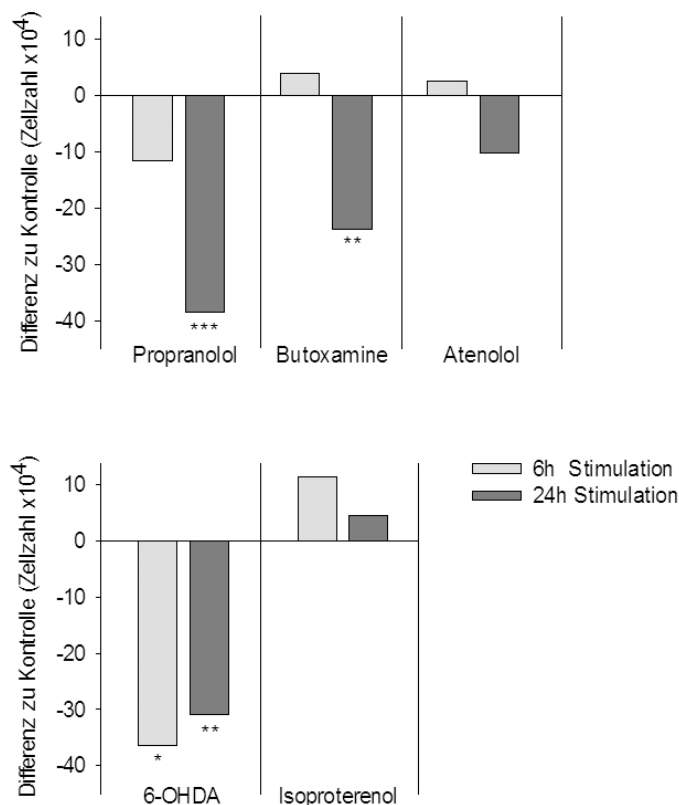
Die neonatal sympathektomierten Tiere wurden an den Tagen d-1, d0 und d1 mit dem  $\beta$ -Agonisten Isoproterenol (10 mg/kg i.p.) behandelt. Nach dem Auslösen wurde die Gelenkschwellung gemessen (A) und das histologische Bild am Tag 7 bewertet (B). Die Kontrolle bilden unbehandelte AIA-Tiere. \*  $p < 0,05$ .

Der Effekt der neonatalen Denervation, der einen im Vergleich zu unbehandelten AIA-Kontrolltieren milderen Arthritisverlauf aufwies (siehe 3.2.1), wurde hierbei durch die Behandlung mit Isoproterenol aufgehoben. Die Schwere der Entzündungsreaktion wurde signifikant erhöht, was sowohl die Werte der Gelenkschwellung als auch die histologische Bewertung zeigen (Abb. 38 A, B). Die Imitation der Signalübertragung des Sympathikus am Tag 0 der AIA übt demnach einen pro-inflammatorischen Einfluss auf den Entzündungsverlauf in zuvor denervierten Mäusen aus. Die wichtige Rolle der Adrenozeptoren bei der neuro-immunologischen Kommunikation wird hierdurch bekräftigt.

### **3.4.3 Beeinflussung der Lymphozytenaktivität**

Nachdem gezeigt wurde, dass sich der Verlauf der AIA durch Antagonisten bzw. Agonisten der Adrenozeptoren *in vivo* beeinflussen lässt, sollte untersucht werden, in welchem Maße diese pharmakologischen Substanzen die Aktivität der Lymphozyten direkt beeinflussen können. Hierzu wurden Lymphozyten von unbehandelten arthritischen Versuchstieren entnommen und *in vitro* mit den jeweiligen Wirkstoffen behandelt. Parameter der allgemeinen Vitalität, der Proliferationsrate sowie der Zytokinproduktion wurden dabei gemessen.

Anhand eines Vitalitätstests, welcher die Lebensfähigkeit der untersuchten Zellen erfasst, wurde der Einfluss der Stimulationszeit verdeutlicht. Der Anteil vitaler Zellen innerhalb der Zellpopulation wurde nach 6 bzw. 24h Inkubation mit den Pharmaka bestimmt und mit unbehandelten Kontrollen verglichen. Dabei ist festzustellen, dass die  $\beta$ -Antagonisten eine deutliche zeitabhängige toxische Wirkung auf die Lymphozyten ausüben. Dieser Effekt ist bei dem unspezifischen  $\beta$ -Blocker Propranolol stärker ausgeprägt als bei den Antagonisten der beiden Subtypen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  (Atenolol und Butoxamine). Im Gegensatz hierzu weist Isoproterenol als Agonist keine zellschädigende Wirkung auf. Weder nach 6 noch nach 24h Stimulationszeit wurde der Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrollsuspension verringert. Der schädigende Einfluss des Neurotoxins 6-OHDA erwies sich als ebenso zeitunabhängig. Beide Versuchsansätze waren hierbei durch eine hohe Anzahl nicht-vitaler Zellen gekennzeichnet (Abb. 39).

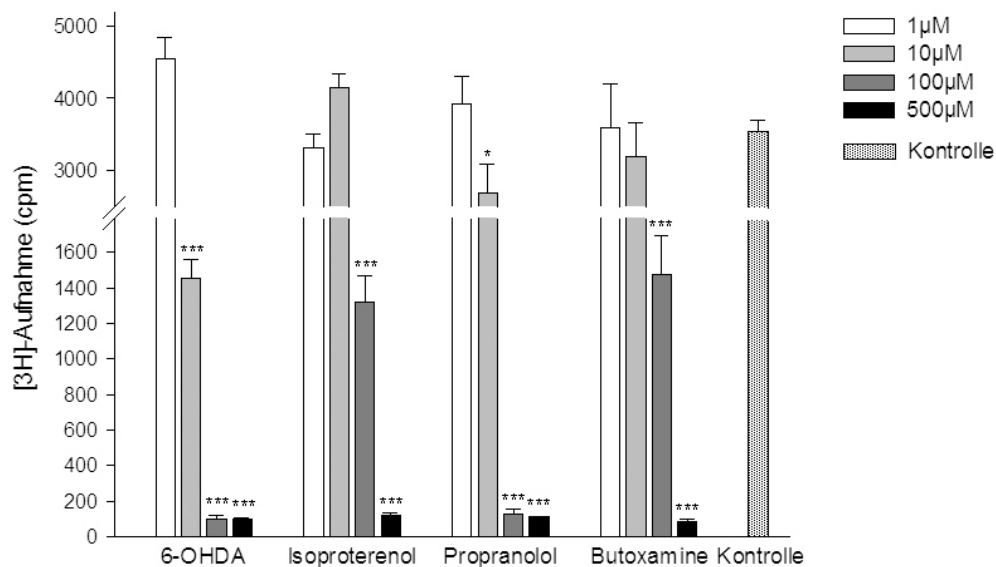


### Abb. 39 Vitalitätstest

Die Lymphozyten wurden aus Milzen gewonnen, welche am Tag 3 der AIA unbehandelten Kontrolltieren entnommen wurden. In vitro wurden sie mit mBSA stimuliert und mit 100  $\mu$ M des jeweiligen Agonisten/Antagonisten für 6 bzw. 24h behandelt. Nach 24h Kultur wurden die vitalen Zellen gezählt und mit den unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Angegeben ist die jeweilige zur Kontrolle abweichende Zellzahl ( $\times 10^4$ ). Zellzahl Kontrolle =  $1,07 \times 10^6$ .  
 \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

Neben der Stimulationszeit nimmt auch die Konzentration der eingesetzten Substanzen entscheidenden Einfluss auf die Vitalität der Lymphozyten. Hierzu wurde in einem Proliferationsassay die Teilungsfähigkeit der Zellen anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin bewertet. 4 verschiedene Konzentrationen der jeweiligen Pharmaka wurden eingesetzt. Die niedrigen Konzentrationen von 1 bzw. 10  $\mu$ M hatten sowohl bei den  $\beta$ -Antagonisten (Propranolol, Butoxamine) als auch bei dem  $\beta$ -Agonisten (Isoproterenol) keinen Einfluss auf die Teilungsfähigkeit der untersuchten Zellen. Erst die Erhöhung auf 100 und 500  $\mu$ M zeigen eine deutliche Wirkung. Ähnlich dem Ergebnis des Vitalitätstests wird auch die Proliferation der Lymphozyten durch den unspezifischen  $\beta$ -Blocker Propranolol am stärksten gehemmt (Abb. 40).

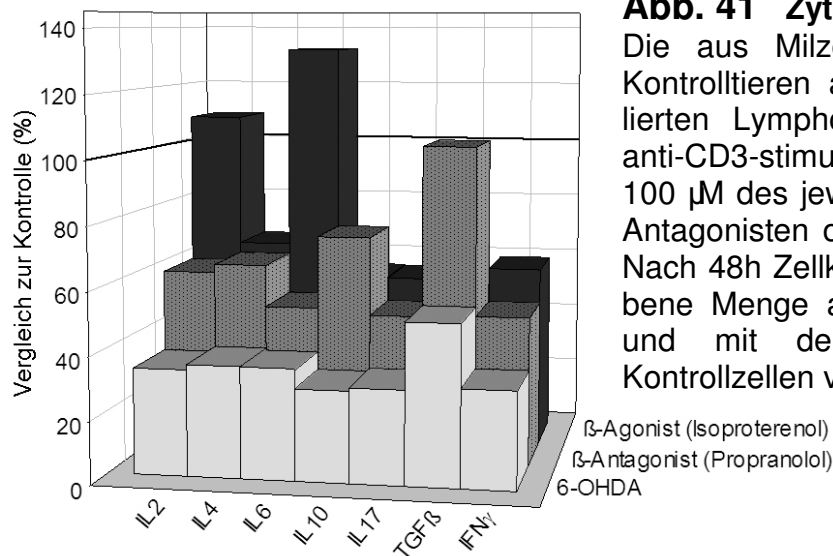
Das Neurotoxin der chemischen Sympathektomie 6-OHDA zeigt bereits bei 10  $\mu$ M eine deutliche Vitalitäts-hemmende Wirkung. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen des Proliferationsassay mit Zellen aus *in vivo*-sympathektomierten Tieren (siehe 3.2.2.2). Diese wiesen am Tag 3 der AIA *ex vivo* keinen Unterschied zu den unbehandelten Kontrolltieren auf.



#### Abb. 40 Proliferationsassay

Die aus Milzen von unbehandelten Kontrolltieren am Tag 3 der AIA isolierten Lymphozyten wurden während des Proliferationsassays *in vitro* mit der jeweilig angegebenen Konzentration an Adrenozeptor-Agonisten/-Antagonisten bzw. 6-OHDA behandelt. Als Kontrolle dienen unbehandelte AIA-Lymphozyten. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die Fähigkeit, im Verlauf einer Entzündungsreaktion Zytokine zu produzieren, gilt als eine der wichtigsten Aufgaben der Lymphozyten. Inwieweit dies von der Stimulation der Adrenozeptoren abhängig ist, wurde deshalb untersucht. Hierfür wurde in der akuten Phase der AIA die Milz entnommen und die daraus gewonnenen Lymphozyten *in vitro* mit anti-CD3 restimuliert und mit einem  $\beta$ -Antagonisten (Propranolol),  $\beta$ -Agonisten (Isoproterenol) oder 6-OHDA behandelt. Es ist zu erkennen, dass die Werte aller Zytokine gegenüber den Mengen der naiven Zellen deutlich verringert sind. Lediglich IL-2 und IL-6 der Isoproterenol-behandelten Zellkultur zeigen einen leicht erhöhten Wert (Abb. 41). Entsprechend den Ergebnissen des Vitalitätstests und des Proliferationsassays weist 6-OHDA das stärkste hemmende Potenzial auf. Propranolol kann als unspezifischer  $\beta$ -Blocker die Menge der synthetisierten Zytokine ebenfalls gegenüber dem  $\beta$ -Agonisten verringern. Diese Daten gehen mit den Resultaten der *in vivo*-Versuche konform, bei denen eine adrenozeptorabhängige Beeinflussung der Entzündungsreaktion auf Ebene der klinischen Parameter der AIA gezeigt werden konnte.



**Abb. 41 Zytokinproduktion**

Die aus Milzen von unbehandelten Kontrolltieren am Tag 3 der AIA isolierten Lymphozyten wurden *in vitro* anti-CD3-stimuliert und für 30min mit 100  $\mu$ M des jeweiligen  $\beta$ -Agonisten/  $\beta$ -Antagonisten oder 6-OHDA behandelt. Nach 48h Zellkultur wurde die abgegebene Menge an Zytokinen gemessen und mit der von unbehandelten Kontrollzellen verglichen.

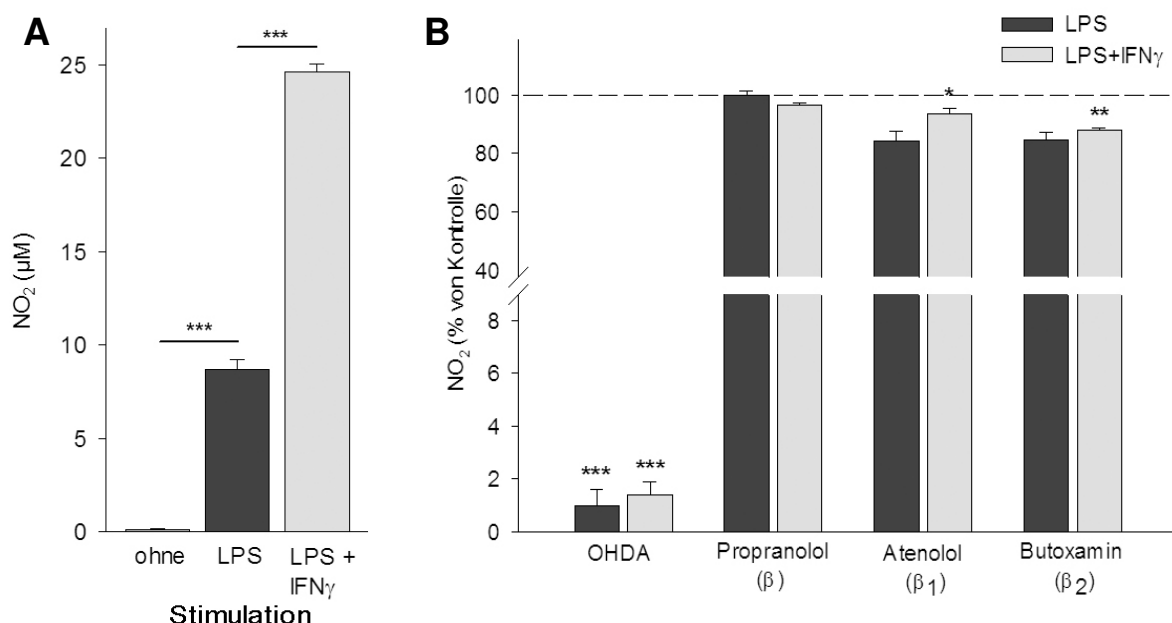
### 3.4.4 Einfluss auf die Makrophagenaktivität

Makrophagen nehmen als Teil des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle im Pathogeneseprozess der rheumatoiden Arthritis und der Antigen-induzierten Arthritis ein. Die Entzündungsreaktion auf das jeweilige Antigen wird dabei durch die Infiltration mononukleärer Zellen in das Gelenk mit geprägt. Makrophagen ermöglichen die Antigenpräsentation für die T-Helfer-Zellen und wirken durch ihre sezernierten Zytokine stimulierend oder hemmend auf die Immunzellen. Die regulatorische Einflussnahme des sympathischen Nervensystems auf die Makrophagen wurde an einem Lipopolysaccharid-vermittelten Entzündungsmodell gezeigt. Demnach kann die Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  durch Noradrenalin moduliert und die Immunantwort infolge einer Infektion entsprechend verändert werden<sup>109,140</sup>. Im AIA-Modell der Ratte wurde zudem die über TNF $\alpha$ -Neutralisation hervorgerufene verminderte Schmerzreaktion auf eine reduzierte Makrophageninfiltration in die Hinterwurzelganglien zurückgeführt<sup>16,134</sup>.

#### 3.4.4.1 Aktivitätszustand der Makrophagen

Inwiefern pharmakologische Substanzen, die den Verlauf der AIA im Mausmodell verändern können, ebenso auf die Aktivität der Makrophagen regulatorisch wirken, war zunächst das Ziel der Untersuchungen. Hierbei wurden Peritonealmakrophagen naiver C57BL/6-Mäuse mit 6-OHDA, verschiedenen  $\beta$ -Blockern sowie Adrenozeptor-Agonisten *in vitro* behandelt. Als Maß des Aktivitätszustandes wird das nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) und IFN $\gamma$  gebildete Stickoxid (NO) bestimmt. Dafür wurden die Art der Stimulation und die Dauer der jeweiligen Behandlung variiert.

Inwiefern die Art der Stimulation Einfluss auf die Aktivität der Makrophagen nimmt, ist anhand des NO-Tests in Abbildung 42 zu sehen. Somit erhöht das von T-Zellen gebildete IFN $\gamma$  die Menge des produzierten NO signifikant und wirkt demnach in Kombination mit dem bakteriellen Antigen LPS kostimulatorisch bzw. synergistisch (Abb. 42 A). Im Gegensatz hierzu ist diese Einflussnahme bei den spezifisch behandelten Zellen nicht zu erkennen. Weder im Fall des Neurotoxins 6-OHDA, durch welches der NO-Gehalt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle massiv gesenkt wird, noch bei den  $\beta$ -Blockern, die eine leichte Reduzierung des Stickoxids anzeigen, sind signifikante Unterschiede zwischen den Stimulationsgruppen erkennbar (Abb. 42 B).

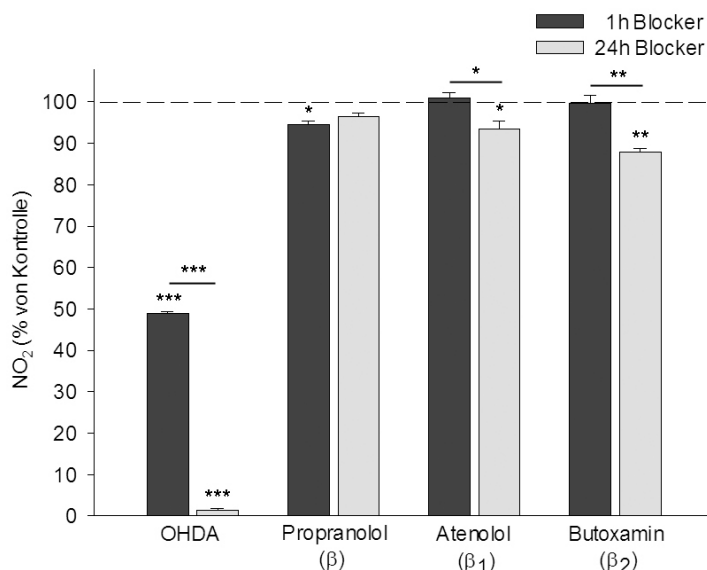


#### Abb. 42 Aktivitätszustand der Makrophagen – Einfluss der Stimulation

Der Aktivitätszustand der Peritonealmakrophagen naiver Mäuse wurde unstimuliert, bzw. nach Stimulation mit LPS/IFN $\gamma$  und 24-stündiger Behandlung mit  $\beta$ -Blockern/6-OHDA anhand der gebildeten Menge NO bestimmt. Unbehandelte Kontrollen (A) dienen als Referenz für die spezifisch behandelten Makrophagen (B). Signifikanzen zu den jeweiligen Kontrollwerten \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Dem gegenüber nimmt die Dauer der Behandlung mit den jeweiligen Antagonisten bzw. 6-OHDA direkt Einfluss auf den Aktivitätszustand der Makrophagen. Werden die Zellen mit LPS und IFN $\gamma$  stimuliert und die Zeitspanne der Behandlung auf 1h verkürzt, verringert sich der hemmende Effekt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant. Sowohl bei 6-OHDA als auch bei den beiden  $\beta$ -Antagonisten Atenolol und Butoxamine ist dies deutlich zu erkennen (Abb. 43). Somit ist

anscheinend eine stimulationsunabhängige, nur über den Zeitfaktor bestimmte Einflussnahme des noradrenergen Systems vorherrschend.

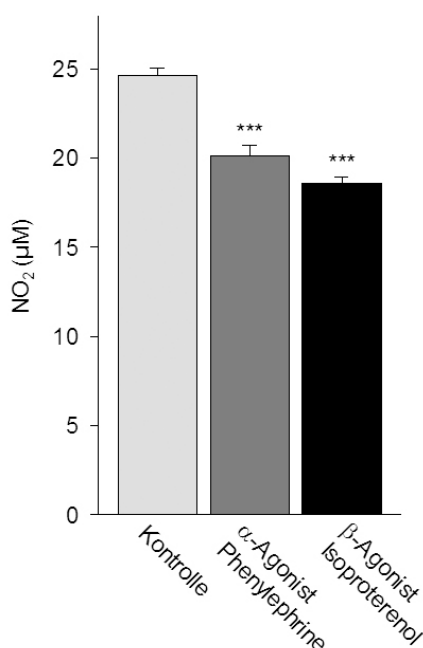


#### Abb. 43 Aktivitätszustand der Makrophagen – Einfluss der β-Antagonisten

Die Makrophagen wurden mit LPS und IFN $\gamma$  stimuliert und für 1 bzw. 24h mit den jeweiligen β-Antagonisten oder 6-OHDA behandelt. Angegeben ist die gebildete Menge NO<sub>2</sub> im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle.

Signifikanz zu den jeweiligen Kontrollwerten: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\*p<0,001

Die Adrenozeptor-Agonisten, welche die Wirkung des Adrenalins bzw. Noradrenalins an den jeweiligen Rezeptoren imitieren, bewirken ebenfalls einen hemmenden Effekt auf den Aktivitätszustand der Makrophagen. Die Menge des produzierten Stickoxids wird hierbei nach 1h Inkubation mit dem α- (Phenylephrine) oder β-Agonisten (Isoproterenol) um rund ein Viertel gegenüber der unbehandelten Kontrolle reduziert (Abb. 44). Dabei ist die Tendenz zu einer effektiveren Wirkung auf Seiten der β-Rezeptoren zu erkennen.



#### Abb. 44 Aktivitätszustand der Makrophagen – Einfluss der α- und β-Agonisten

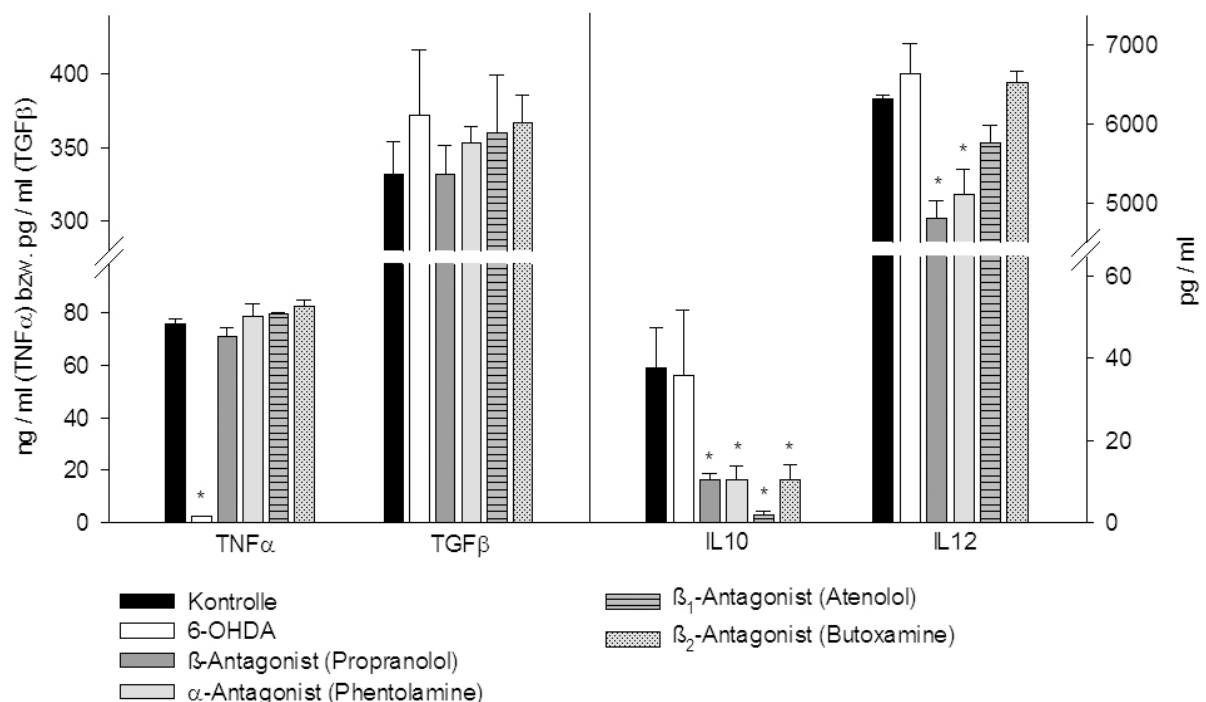
Die Peritonealmakrophagen wurden mit LPS + IFN $\gamma$  stimuliert und für 1h mit den Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrine (α) bzw. Isoproterenol (β) kultiviert. \*\*\* p < 0,001



### 3.4.4.2 Zytokinproduktion der Makrophagen

Eine Hauptaufgabe der Makrophagen im Pathogeneseprozess der AIA liegt in der Zytokinproduktion. Dabei werden sowohl pro- (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ ) als auch anti-inflammatorische Zytokine (IL-10, TGF $\beta$ ) synthetisiert.

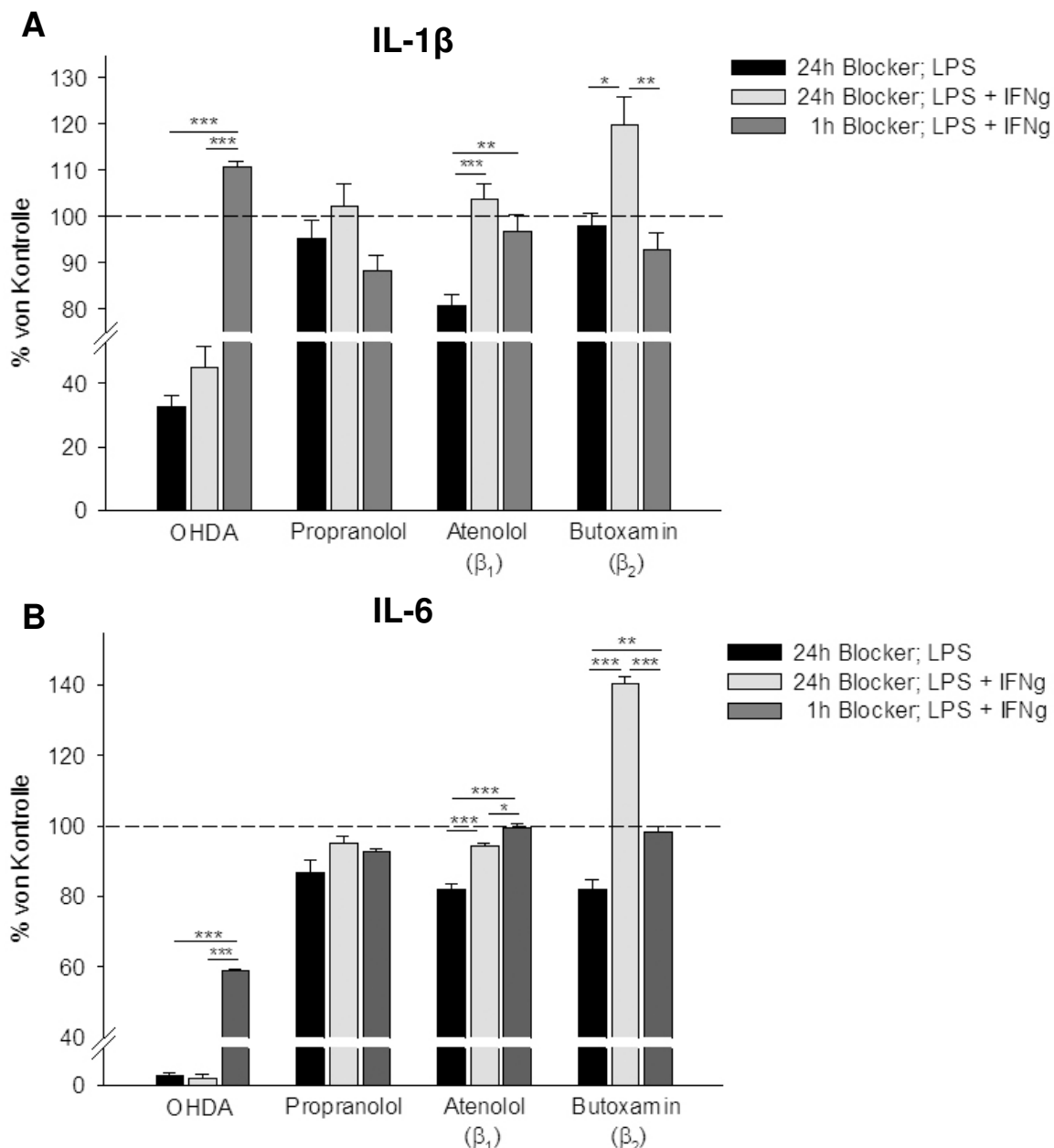
Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Adrenozeptor-Antagonisten auf das Zytokinprofil der Makrophagen untersucht. Dafür wurden diese nach Gewinnung aus dem Peritoneum arthritischer Mäuse (d18 AIA) *in vitro* mit LPS und IFN $\gamma$  stimuliert und anschließend mit den jeweiligen pharmakologischen Substanzen zusammen kultiviert. Es ist festzustellen, dass das Neurotoxin 6-OHDA bei 24-stündiger Kultur die Mengen an pro-inflammatorischen TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant senkt, während die anti-inflammatorischen Zytokine TGF $\beta$  und IL-10 sowie IL-12 in ihrem Gehalt unverändert bleiben (Abb. 45, 46). Ebenso ohne regulatorischen Effekt blieb der unspezifische  $\beta$ -Blocker Propranolol, bezogen auf die Mengen an produziertem TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$  und IL-6. Lediglich IL-10 und IL-12 wurden vermindert abgegeben. Gleiches galt für den  $\alpha$ -Antagonisten Phentolamine.



**Abb. 45 Zytokinproduktion der Makrophagen - Einfluss der Antagonisten**

Die Peritonealmakrophagen arthritischer C57BL/6-Mäuse (AIA d18) wurden *in vitro* mit LPS + IFN $\gamma$  stimuliert und für 24h zusammen mit Adrenozeptor-Antagonisten kultiviert. Anschließend wurde die Menge der gebildeten Zytokine mittels ELISA gemessen. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die Antagonisten der Adrenozeptor-Subtypen  $\beta_1$  (Atenolol) und  $\beta_2$  (Butoxamine) zeigten hinsichtlich der Menge an TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  und IL-10 die gleiche Wirkung wie der unspezifische  $\beta$ -Blocker Propranolol. IL-12 wurde durch Atenolol nur tendenziell vermindert und blieb nach Butoxamin-Behandlung unverändert (Abb. 45). Die Mengen an IL-1 $\beta$  und IL-6 wurden durch Butoxamin sogar leicht erhöht (Abb. 46 A, B).

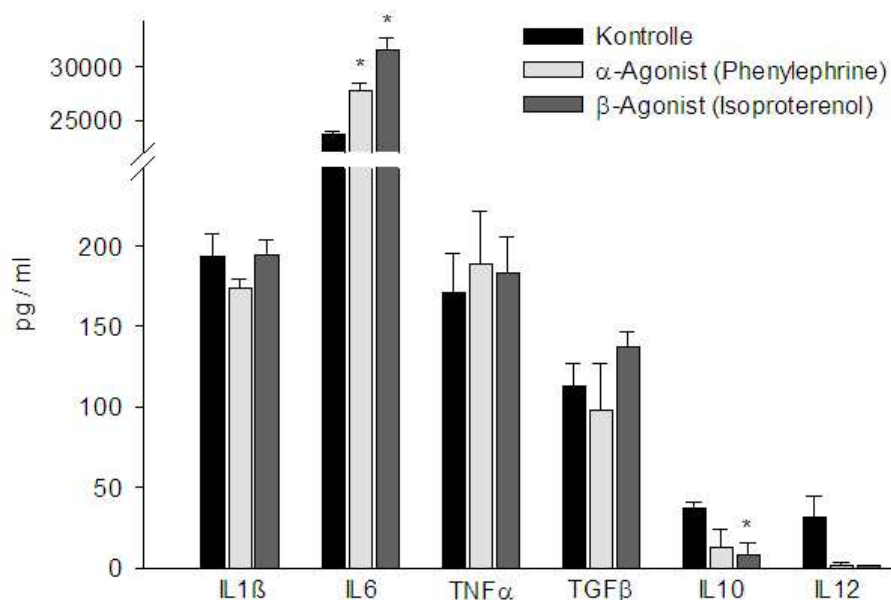


**Abb. 46 Zytokinproduktion der Makrophagen - Fokus auf IL-1 $\beta$  und IL-6**

Die von Peritonealmakrophagen arthritischer Mäuse (AIA d18) gebildete Menge an IL-1 $\beta$  (A) und IL-6 (B) wurde nach vorheriger Stimulation mit LPS/IFN $\gamma$  und Behandlung mit  $\beta$ -Antagonisten bzw. 6-OHDA (1h/24h) mittels ELISA gemessen. Angegeben ist das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Am Beispiel von IL-1 $\beta$  und IL-6 wurde ebenfalls untersucht, inwiefern die Art der Stimulation und die Dauer der Behandlung mit den Antagonisten Einfluss nehmen. Abweichend von den Standardbedingungen (LPS + IFN $\gamma$ ; 24h Kultur) ergab sich bei der 6-OHDA-Behandlung durch Verkürzen der Inkubationszeit auf 1h eine Reduzierung bzw. Aufhebung des hemmenden Effekts. Durch eine schwächere Stimulation der Zellen (ohne IFN $\gamma$ ) konnte auch bei Atenolol ( $\beta_1$ ) ein hemmender Effekt bezüglich der Menge an IL-1 $\beta$  und IL-6 hervorgerufen werden (bei IL-6 ebenso durch Butoxamin ( $\beta_2$ )). Die Behandlungszeit spielte hierbei keine Rolle. Im Falle des  $\beta_2$ -Antagonisten wurde der fördernde Effekt durch eine unvollständige Stimulation und eine verkürzte Inkubationsdauer ebenfalls aufgehoben (Abb. 46).

Im Gegensatz zu den Adrenozeptor-Antagonisten, welche nach Bindung an den jeweiligen Rezeptor die Wirkung des Noradrenalins aufheben, imitieren Agonisten diese. Dadurch ist bei stimulierten Makrophagen ein fördernder Effekt auf das pro-inflammatorische IL-6 und eine hemmende Wirkung, bezogen auf die Menge von anti-inflammatorischem IL-10 und IL-12 zu erkennen. Tendenziell zeigen die  $\beta$ -Agonisten hierbei einen stärkeren Wirkungsgrad. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und TGF $\beta$  bleiben hingegen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen unverändert (Abb. 47).



**Abb. 47 Zytokinproduktion der Makrophagen - Einfluss der Agonisten**

Nach Stimulation mit LPS und IFN $\gamma$  und 1h Kultivierung mit  $\alpha$ - (Phenylephrine) oder  $\beta$ -Agonisten (Isoproterenol) wurde in den Überständen die Menge der gebildeten Zytokine mittels ELISA bestimmt. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

### 3.4.5 Zusammenfassung

Ziel der Untersuchungen war es aufzuklären, inwiefern die Agonisten und Antagonisten von Noradrenalin, als postganglionärem Transmitter des sympathischen Nervensystems, Einfluss auf die Schwere der AIA nehmen können. Es konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten die Schwere der Gelenkschwellung signifikant senken können, wobei die  $\beta$ -Blocker eine stärkere Wirkung zeigten. Im Vergleich der  $\beta$ -Subtypen erwiesen sich ab dem dritten Tag der akuten Phase die  $\beta_2$ -Blocker als deutlich effektiver und ließen die Gelenkschwellung bis zum Beginn der chronischen Phase komplett abklingen.

Hingegen wurde die anti-inflammatorische Wirkung der Sympathektomie durch den  $\beta$ -Agonisten Isoproterenol, verabreicht am Tag 0 der AIA bei neonatal sympathektomierten Mäusen, aufgehoben. Die bedeutende Rolle der Adrenozeptoren bei der neuro-immunologischen Kommunikation im Modell der AIA konnte somit bekräftigt werden.

Inwieweit die Lymphozyten auf zellulärer Ebene beeinflusst werden, wurde im Folgenden *in vitro* untersucht. Während die Antagonisten eine stark von der Stimulationszeit abhängige zellschädigende Wirkung aufwiesen, wurde die Vitalität der Zellen durch die Agonisten nicht geschwächt. 6-OHDA selbst zeigte ein starkes toxisches Potenzial. Ein ähnliches Bild ergaben die Ergebnisse eines Proliferationsassays. Die für die Hemmung der Zellteilung nötigen Konzentrationen des  $\beta$ -Agonisten und des  $\beta_2$ -Blockers waren hierbei höher als die von 6-OHDA und Propranolol. Des Weiteren konnte am Zytokinprofil der Lymphozyten gezeigt werden, dass sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine in ihrer sezernierten Menge durch 6-OHDA,  $\beta$ -Antagonisten und  $\beta$ -Agonisten vermindert werden. Lediglich IL-2 und IL-6 wurden nach *in vitro*-Behandlung mit dem Agonisten im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht.

Makrophagen, die im Pathogeneseprozess der AIA eine wichtige Rolle spielen, können ebenfalls durch verschiedene Pharmaka beeinflusst werden. So wird die Menge des produzierten Stickoxids, welches als Maß für den Aktivitätszustand dieser Zellen steht, durch das Neurotoxin 6-OHDA stark und durch  $\beta$ -Blocker der Subtypen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  geringfügig reduziert. Während die Dauer der jeweiligen Behandlung für diesen Effekt mitbestimmend ist, hat die Art der Zellstimulation (LPS/IFN $\gamma$ ) keinen Einfluss. Neben diesen Antagonisten kann durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Agonisten die gleiche Stickoxid-reduzierende Wirkung erzielt werden.

Auf der Ebene des Zytokinprofils lässt sich herausstellen, dass 6-OHDA lediglich die pro-inflammatorischen Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) in ihrer Menge mindern

kann. IL-10, IL-12 und TGF $\beta$  bleiben gegenüber der unbehandelten Kontrolle unverändert.

Die *in vitro*-Behandlung mit  $\beta$ -Blockern erzielt indes gegenteilige Effekte. So werden die entzündungshemmend bzw. regulatorisch wirkenden Zytokine IL-10 und IL-12 reduziert, während pro-inflammatorisches IL-1 $\beta$  und IL-6 durch den  $\beta_2$ -Antagonisten verstärkt gebildet wird. Die übrigen untersuchten Interleukine (TNF $\gamma$ , TGF $\beta$ ) blieben hierbei unverändert im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

Ebenso können Adrenozeptor-Agonisten das Zytokinprofil der Makrophagen beeinflussen. Dabei wird IL-6 erhöht, während IL-10 sowie IL-12 vermindert werden. Die  $\beta$ -Agonisten zeigen dabei tendenziell einen etwas höheren Wirkungsgrad. IL-1 $\beta$ , TNF $\gamma$  und TGF $\beta$  bleiben unverändert.

## 4. Diskussion

„It takes nerve to tell T and B cells what to do“ – so lautete der Titel eines 2006 von Virginia M. Sanders veröffentlichten Review, in dem das komplexe Zusammenspiel zwischen Nerven- und Immunsystem sprichwörtlich verdeutlicht wurde<sup>74</sup>.

Zur Aufrechterhaltung der inneren Homöostase werden die Vitalfunktionen des Organismus durch das vegetative Nervensystem kontrolliert. Über efferente Neuronen, die im Fall des Sympathikus Noradrenalin (NA) als postganglionären Transmitter verwenden, gelangen Informationen vom Zentralnervensystem in die Peripherie. Hierfür sind alle Regionen des Körpers, insbesondere Areale, die potenziell Antigenen ausgesetzt sind, von Bahnen des sympathischen Nervensystems (SNS) innerviert. Ebenso exprimieren Immunzellen Adrenozeptoren, worüber die neuro-immunologische Kommunikation realisiert wird. Die Einflussnahme des SNS ist dabei vielgestaltig. Regulatorische T-Zellen produzieren beispielsweise nach Stimulation mit Noradrenalin geringere Mengen der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF $\beta$ <sup>31</sup>. B-Zellen aus NA-defizienten Mäusen geben in reduziertem Maß Immunglobulin G ab, ein Effekt, der über die Stimulation des  $\beta_2$ -Adrenozeptor wieder aufgehoben werden kann<sup>109</sup>. Die Rolle des SNS bei Autoimmunkrankheiten ist ebenso mannigfaltig. So kann im Fall der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) eine Wechselwirkung zwischen Immun- und Nervensystem festgestellt werden, die sowohl die Parameter der Entzündung als auch die Konzentration an neuronalen Botenstoffen verändern kann. Die Modulation der Gelenkschwellungswerte sowie des Gehalts an Adrenalin und Corticosteron im Hypothalamus sind dabei abhängig vom jeweiligen Status der Erkrankung<sup>36,58</sup>.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Einflussnahme des SNS im murinen Modell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) analysiert werden.

### 4.1 Die chemische Sympathektomie mit 6-Hydroxydopamin

Die Milz als sekundäres lymphatisches Organ wird von noradrenergen, nicht aber von cholinergen Fasern versorgt<sup>10,141</sup>. Bereits 1981 zeigten Williams et al., dass die systemische Sympathektomie mit 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) die Immunantwort in Mäusen verändern kann<sup>164</sup>. Ebenso wurde bestätigt, dass ein intakter Noradrenalin-Transporter für das Feintuning der Zytokinbalance bei Entzündungsprozessen nötig ist<sup>135</sup>. Die mögliche Einflussnahme des SNS auf den stark T-Zell-abhängigen Pathogeneseprozess der AIA wurde in der vorliegenden Arbeit durch die intraperitoneale Gabe von 6-OHDA untersucht. Nach Aufnahme

des Neurotoxins über die Katecholamin-Wiederaufnahmetransporter der Nervenendigungen kommt es infolge des 6-OHDA-Abbaus zur Bildung von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten, welche als Mediatoren der Apoptose wirken. Dies resultiert in der selektiven Zerstörung noradrenerger Neurone.

Im Milzgewebe der sympathektomierten Tiere wurde am ersten Tag nach der Behandlung chromatographisch eine Verringerung des Noradrenalin-Gehalts um 93% gemessen. Diese blieb innerhalb der akuten Entzündungsphase signifikant unter den Werten der unbehandelten Kontrollen und erreicht erst am Tag 35 nach Gabe von 6-OHDA wieder 83% des Ausgangswerts. Dieser allmähliche Anstieg ist mit der Reinnervation des Organs durch noradrenerge Fasern zu erklären. Diese geht entlang der die Milz versorgenden Arterie und dauert bis zu 56 Tage an<sup>92</sup>. Trotz der Wiederherstellung des ursprünglichen Gehalts an Noradrenalin erreicht die Faserdichte dabei nicht wieder den Wert vor der Sympathektomie. Die reduzierte Menge an Tyrosin-Hydroxylase wurde ebenfalls als Nachweis der Denervation angebracht. Mittels Western Blot konnte dieses Schlüsselenzym der Noradrenalinsynthese in den Lymphknoten und der Milz nachgewiesen werden. Am Modell der Ratte wurde bereits gezeigt, dass die Gabe von 6-OHDA zu einer Abnahme der Aktivität dieses Enzyms führt und diese 21 Tage anhält<sup>1</sup>. In unseren Untersuchungen konnte dies gegenüber den naiven Kontrollen bestätigt werden.

Im Unterschied zur Verringerung der Konzentrationen an Noradrenalin und Tyrosin-Hydroxylase wurden das Milzgewicht und die Zahl der Lymphozyten infolge der Sympathektomie nicht reduziert. Dies steht etwas im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, bei denen eine 6-OHDA-bedingte Atrophie des Thymus nachgewiesen wurde<sup>151</sup>. Ein solcher Effekt, der mit Funktionseinschränkung des Organs einhergeht, konnte bei den sekundären lymphatischen Organen im Modell der AIA nicht bestätigt werden. Der Erhalt der organspezifischen Funktionalität trotz Sympathektomie wird somit bekräftigt.

Des Weiteren wurde in den ersten 7 Tagen nach erfolgter chemischer Sympathektomie ein Gewichtsverlust bei den Versuchstieren festgestellt. Neben sonstigen normalen Vitalfunktionen betrug dieser am Tag 1 nach Behandlung ~7% und reduzierte sich im weiteren Verlauf stetig bis zum Erreichen des Ausgangswertes. Ein gleicher Effekt wurde bereits für Katecholamin-Wiederaufnahmehemmer bei Mäusen beschrieben. Er geht mit einer gesteigerten Körpertemperatur bei gleich bleibender Nahrungsaufnahme einher und führt durch den somit bedingten erhöhten Energieumsatz zu einer Gewichtsabnahme<sup>13</sup>. Höchstwahrscheinlich ist dies auch als Ursache der Veränderung im vorliegenden Modell zu sehen.

Die chemische Sympathektomie stellt somit eine zweckmäßige Methode dar, um selektiv noradrenerge Nervenfasern in den sekundären lymphatischen Organen temporär zu zerstören. Die Zielorgane werden denerviert, bleiben dabei jedoch voll funktionsfähig. Dies ist für die nachfolgenden Untersuchungen bezüglich der Interaktion zwischen SNS und Immunsystem eine wichtige Voraussetzung.

## **4.2 Der Einfluss des SNS auf den Verlauf der AIA**

Die funktionelle Rolle des SNS bei der Modulation der humoralen Immunantwort ist bereits seit langem bekannt. In einem Infektionsmodell an der Maus konnte infolge der chemischen Sympathektomie eine erhöhte Antikörperantwort nach Antigenkontakt feststellen werden<sup>164</sup>. Dass diese Einflussnahme auch die T-Zell-vermittelte Immunität einschließt und die charakteristischen Immunparameter der Lymphozyten verändern kann, wurde in den darauf folgenden Jahren erstmals gezeigt<sup>95,96</sup>. Hierbei rückte die Rolle des SNS bei Autoimmunkrankheiten zunehmend in den Fokus der Forschung. Experimentelle Tiermodelle der rheumatoiden Arthritis (RA) stellen dafür geeignete Untersuchungssysteme dar. Bislang konnte jedoch noch kein Konsens gefunden werden, der die neuroimmunologische Wechselwirkung im Allgemeinen beschreibt. Die unterschiedlichen Protokolle der Arthritismodelle erlauben keine generalisierte Betrachtungsweise auf die vorherrschenden Pathogenesemechanismen, wodurch dem SNS ungleiche Eigenschaften bei der Einflussnahme auf das Immungeschehen zugesprochen werden. Sowohl ein pro- als auch ein anti-inflammatorischer Charakter des SNS wurden beschrieben, wobei der Zeitpunkt der Sympathektomie in Bezug zum Antigenkontakt und der jeweiligen klinischen Phase der Erkrankung entscheidend zu sein scheint<sup>58,114</sup>. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des Sympathikus im murinen Modell der AIA beschrieben werden. Da es bisher keine Untersuchungen in dieser Richtung gab, galt es zunächst den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem die Denervation den AIA-Verlauf am effektivsten modulieren kann. Hierfür wurden verschiedene Schemata mit der Sympathektomie vor, während oder nach dem Auslösen der AIA und in zeitlichem Bezug zur Immunisierungsphase getestet. Der deutlichste Effekt der chemischen Sympathektomie (150 mg/kg 6-OHDA i.p.), der mit einer starken Reduzierung der Gelenkschwellung einher geht, wurde bei der Denervation an den Tagen d-1 bis d1 erzielt. Mit zunehmender zeitlicher Entfernung von diesem Punkt nahm auch die anti-inflammatorische Wirkung der Sympathektomie ab. Ebenso konnte die Denervation vor der Immunisierungsphase am Tag -21 den Verlauf der AIA nicht beeinflussen. Dies stellt einen Unterschied zu jüngsten Ergebnissen am murinen



Modell der CIA dar, bei dem die Sympathektomie vor der ersten Immunisierung der Versuchstiere begonnen wurde, um eine anti-inflammatorische Wirkung zu erreichen<sup>58,59</sup>. Die Aktivität des SNS während der Immunisierungsphase scheint demnach je nach Modell eine verschiedene Relevanz zu besitzen. Die Experimente von Coderre et al. am Beispiel der Adjuvans-Arthritis (AA) unterstützen diese Annahme. Die Stimulation des SNS während der Immunisierungsphase erhöht hierbei die Schwere der nachfolgenden Erkrankung, während die Hemmung einen milderen Arthritisverlauf bewirkt<sup>30</sup>. Folglich scheint im vorliegenden Fall der AIA der Einfluss des sympathischen Nervensystems auf das Immunsystem vor dem Antigenkontakt im Gegensatz zur CIA und AA weniger stark ins Gewicht zu fallen. Ungeachtet dessen wurde auch durch die neonatale Sympathektomie die Schwere der AIA signifikant verringert. Dieses Ergebnis war nicht unerwartet, da bereits 1986 gezeigt wurde, dass neonatal verabreichtes Capsaicin, ein Neurotoxin, welches die peripheren afferenten Neurone zerstört, einen anti-inflammatorischen Effekt induziert<sup>89</sup>. Am Rattenmodell der AA wurde hierbei die Gelenkzerstörung wesentlich verringert. Im Fall des hier verwendeten Neurotoxins 6-OHDA ist diese Wirkung auf eine lang anhaltende Zerstörung peripherer und zentraler noradrenerger Neurone zurückzuführen. Von dieser Denervation ist in besonderem Maße die Milz betroffen, wodurch Wachstum und Differenzierung der B- und T-Lymphozyten stark beeinträchtigt werden<sup>2</sup>. Ebenso werden die primären lymphatischen Organe Thymus und Knochenmark denerviert, was die Entwicklung eines vollständig ausgebildeten Immunsystems im adulten Tier behindert.

Im Folgenden galt es, den AIA-Verlauf bei sympathektomierten Tieren zu charakterisieren. Dabei sollten mit der akuten und chronischen Phase sowie der Flare-up-Reaktion nach erneutem Antigenkontakt die drei verschiedenen Entzündungsstadien verglichen werden. Die klinische Bewertung der AIA erfolgte durch Messung der Schwellung am arthritischen Kniegelenk und lichtmikroskopische Beurteilung der Entzündungsparameter im histologischen Bild. In der akuten Phase der AIA konnte die Schwere der Gelenkschwellung infolge der chemischen Sympathektomie um ~50% gesenkt werden. Im weiteren zeitlichen Verlauf glichen sich die Messwerte denen der unbehandelten Tiere wieder an und entsprachen ab dem 7. Tag der AIA-Kontrollgruppe. Diese Daten wurden im histologischen Bild bestätigt. Es konnte am Tag 3 der AIA eine geringere granulozytäre und mononukleäre Infiltration sowie eine schwächere synoviale Hyperplasie in den Gelenken der sympathektomierten Tiere festgestellt werden. Dieses Resultat entspricht den Ergebnissen aus anderen experimentellen Arthritismodellen, bei denen die Aktivität des SNS zum Zeitpunkt der Antigen-

Applikation blockiert wurde<sup>58,88</sup>. Zurückzuführen ist dieser Effekt höchstwahrscheinlich auf die Hemmung der neurogenen Entzündung, einem Prozess, der das Entzündungsgeschehen in der sehr frühen Phase einer experimentellen Arthritis (Stunden bis wenige Tage) hauptsächlich prägt. Hierbei kommt es infolge der noxischen Stimulation afferenter Nervenendigungen im Kniegelenk zu einem Axonreflex, der wiederum die Freisetzung von Neuropeptiden in der Peripherie bewirkt. Substanz P und CGRP (calcitonin gene-related peptide) sind hierbei die Hauptmediatoren und führen zur Aktivierung von Immunzellen<sup>61,149</sup>. Gekennzeichnet ist dieser Prozess durch die klinischen Symptome der Rötung, Hitze, Schwellung und Schmerz. Unterstützt wird diese Reaktion unter anderem durch das SNS, so dass die sympathische Denervation die neurogene Entzündung begrenzen kann und typische Parameter wie Plasmaextravasation und Vasodilatation, welche für die Chemotaxis der Leukozyten wichtige Stimulanzen des Entzündungsgeschehen sind, reduziert<sup>39</sup>.

In der chronischen Entzündungsphase konnte dieser immunmodulatorische Effekt nicht nachgewiesen werden. Die Sympathektomie zum Zeitpunkt des Auslösens der AIA beeinflusste den Verlauf der Gelenkschwellung in dieser späten Phase ebenso wenig wie die chemische Denervation an den Tagen d11 - d13. Dies stellt einen klaren Unterschied zum Modell der CIA dar, bei dem zu diesem späten Zeitpunkt eine pro-inflammatorische Wirkung der Sympathektomie erzielt wurde<sup>58</sup>. Die erhöhten Schwellungswerte im Vergleich zur Kontrollgruppe lassen dabei auf einen anti-inflammatorischen Charakter des sympathischen Nervensystems schließen, welcher durch die Denervation aufgehoben wird. Entsprechend dieser Erkenntnis verstärkt eine Stimulation des SNS zu diesem Zeitpunkt dessen entzündungshemmende Eigenschaften und führt zu einem mildereren Krankheitsverlauf. In den Modellen der AA und CIA wurde dies mittels Applikation von  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten dargelegt<sup>94,98</sup>. Begründet wird dieser Effekt mit einer entzündungsbedingten Änderung der Expression und Signalübertragung von Adrenozeptoren auf Immunzellen. Diesbezüglich konnte bei RA-Patienten eine Herunterregulierung von  $\beta$ -Adrenozeptoren sowie eine Entkopplung vom Second-Messenger-System nachgewiesen werden<sup>6,91</sup>. Das SNS kann demzufolge nicht mehr seiner Funktion der homöostatischen Regulation von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen nachkommen, was letztendlich in einem entzündlichen Milieu im Gelenk resultiert. Verbunden mit diesen Änderungen auf der Ebene der Adrenozeptoren wird der bei AA und CIA beobachtete gegensätzliche Charakter des SNS ebenso durch die zelluläre Zusammensetzung in den Gelenken mitbestimmt. Während in der Immunisierungsphase die T- und B-Lymphozyten sowie die antigenpräsentierenden Zellen die Hauptrolle spielen, werden in der

symptomatischen Phase mit Beginn der Arthritis weitere Zelltypen aktiviert bzw. infiltrieren das artikuläre Gewebe. Hierzu zählen Granulozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten. Damit erhöht sich zum einen die Anzahl der Zielstrukturen für sympathische Transmitter und zum anderen kann die veränderte Mikroumgebung im entzündeten Gelenk die neuroimmunologischen Signalwege modulieren<sup>88</sup>. Im Modell der AIA beginnt dieser Prozess unmittelbar nach der intraartikulären Antigenapplikation am Tag 0 und folgt damit direkt auf die Sympathektomie (d-1 - d1). Dies stellt einen entscheidenden Unterschied gegenüber der CIA dar, bei der zwischen Antigenkontakt und Ausbruch der Erkrankung eine Zeitspanne von ~12 Tagen liegt und die Sympathektomie die Immunisierungsphase mit einschließt. Des Weiteren sind die klinischen Symptome zwischen AIA und CIA in ihrer Verlaufsform verschieden. Während man im vorliegenden Modell eine klare Trennung zwischen akuter und chronischer Phase ziehen kann, ist die CIA durch eine lang anhaltende und gleich bleibende Entzündungsreaktion gekennzeichnet. Die unterschiedliche Bedeutung der adaptiven und angeborenen Immunität in den verschiedenen Phasen der Arthritis kann als Grundlage der Ungleichheit zwischen AIA und CIA gesehen werden. Während bei der AIA stetig eine Dominanz der erworbenen Immunität vorherrscht, wird die CIA im späteren Verlauf durch das angeborene Immunsystem stärker geprägt.

Berücksichtigt man zusammenfassend die Unterschiede des Zeitschemas mit Sympathektomie, Antigenkontakt und klinisch symptomatischen Verlauf, so wird die Ungleichheit zwischen den beiden Modellsystemen ersichtlich, wodurch bis dato noch keine genaue Erklärung für die unterschiedliche Einflussnahme des SNS ermöglicht wird.

Durch eine erneute intraartikuläre Applikation des Antigens am Tag 21 kann im Modell der AIA eine Flare-up-Reaktion erzeugt werden, welche die bestehende chronische Phase überlagert und den akuten Entzündungsschüben im Krankheitsbild der RA ähnelt<sup>87</sup>. Die chemische Sympathektomie zum Zeitpunkt des zweiten Auslösens (d20 - d22) führt dabei wie in der primären Entzündungsreaktion zu einer Reduktion der Gelenkschwellung um ~45%. Im weiteren Verlauf glichen sich die Messwerte zwischen den Versuchsgruppen wieder an und entsprachen ab dem 6. Tag (d27) wieder denen der unbehandelten AIA-Kontrolltiere. Dies entspricht der Wirkungsweise zur primären akuten Phase und kann vermutlich ebenso über den zuvor beschriebenen Prozess der neurogenen Entzündung erklärt werden. Im Gegensatz zur primären Entzündungsreaktion sind bei der histologischen Bewertung am Tag 34 keine Unterschiede zwischen sympathektomierten und unbehandelten AIA-Tieren erkennbar. Dies wird

besonders durch die Beurteilung der synovialen Hyperplasie, der mononukleären Infiltration sowie der Knorpel- und Knochendestruktion gekennzeichnet. Da die Flare-up-Reaktion die bestehende chronische Phase überlagert, sind diese klassisch chronisch-entzündlichen Parameter erwartungsgemäß nicht verändert. Überraschenderweise wurde die Gelenkschwellung des Flare-up aber auch durch die Sympathektomie am Tag 0 der primären Entzündungsreaktion signifikant reduziert. Der Effekt der Denervation hält demnach in diesem Fall 21 Tage an, was im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Sympathektomie am Tag -21 steht. Die Behandlung mit 6-OHDA zu Beginn der Immunisierungsphase zeigte keine Auswirkung auf die Gelenkschwellung der akuten Phase. Dies bestätigt die gewonnenen Erkenntnisse, dass die anti-inflammatorische Wirkung der Sympathektomie im Modell der AIA nur bei einer Denervation zum Zeitpunkt des Antigenkontaktes realisiert werden kann und dass nur die klinischen Symptome der akuten Phase reduziert werden.

In den folgenden Untersuchungen sollte die Art und Weise, wie das sympathische Nervensystem im Modell der AIA Einfluss auf das Immungeschehen nehmen kann, genauer charakterisiert werden. Neben der Modulation von Proliferation und Zytokinproduktion der Immunzellen kann das SNS ebenso die Adrenozeptor-expression und die Balance zwischen zellulärer und humoraler Immunantwort beeinflussen<sup>95</sup>. Somit wird die Stärke der Immunantwort auf Antigene durch die sympathische Signalübertragung innerhalb lymphatischer Organe beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür der Gehalt an Immunglobulin G (IgG) im Serum sowie die Proliferationsfähigkeit und Zytokinproduktion von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten in der akuten Phase der AIA gemessen. Bei dem von Plasmazellen vorrangig in der sekundären Immunantwort sezernierten IgG wurden der Gesamtiter sowie der Gehalt der jeweiligen Subklassen bestimmt. Zusätzlich wurde zwischen unspezifischen und Antigen-spezifischen IgG unterschieden. Als Antigene wurden mBSA und die körpereigenen Bestandteile der Knorpelmatrix Kollagen Typ I und II und Proteoglykane berücksichtigt. Signifikante Veränderungen waren am Tag 3 der AIA in den Konzentrationen der mBSA-spezifischen Subklassen IgG2a und IgG2b sowie der Auto-Antikörper gegen Kollagen Typ I messbar. Diese Immunparameter zeigten bei den sympathektomierten Tieren verringerte Werte gegenüber den AIA-Kontrollen an. Ebenso waren die Mengen der Auto-Antikörper gegen Kollagen Typ II und Proteoglykane tendenziell reduziert. Die restlichen IgG-Subklassen zeigten keine Konzentrationsänderungen infolge der Sympathektomie an.

Dass die T-Zell-abhängige Antikörperproduktion *in vivo* vom sympathischen Nervensystem beeinflusst werden kann, ist bereits seit langem bekannt<sup>69</sup>. Die Stimulation der  $\beta_2$ -Adrenozeptoren ( $\beta_2$ -AR) von B-Zellen führt zu einer Aktivitätssteigerung, die in der vermehrten Produktion von IgG1 und IgE deutlich wird<sup>78,119</sup>. Ebenso wirkt sich die Defizienz für Noradrenalin bei Mäusen in einer verringerten IgG-Produktion aus, die durch die Stimulation der  $\beta_2$ -AR wieder aufgehoben werden kann<sup>109</sup>. Durch die chemische Sympathektomie sind jedoch gegenteilige Effekte induzierbar. In Abhängigkeit vom Entzündungsmodell und dem dafür verwendeten Mausstamm wurden sowohl eine Reduzierung als auch eine Erhöhung der Mengen an IgG gemessen<sup>83</sup>. Die jeweilig vorherrschende Dominanz des Typs an T-Helfer-Zellen (Th) wird hierfür verantwortlich gemacht. Die antigenspezifischen Subklassen IgG2a und IgG2b, die im vorliegenden Modell reduziert wurden, werden durch die Th1-Zellen bzw. deren Zytokine (IL-2, IFN $\gamma$ ) vermittelt<sup>18</sup>. Ein direkter Zusammenhang zwischen Th1-Zytokinen und diesen IgG-Subklassen wurde auch bereits im AIA-Modell dargelegt<sup>66</sup>. Das Fehlen von IFN $\gamma$  führt dabei zur signifikanten Verringerung von IgG2a und IgG2b.

Ob der in der vorliegenden Arbeit durch die Sympathektomie hervorgerufene anti-inflammatorische Effekt auch auf einer Modulation des Zytokinprofils beruht, galt es im Folgenden zu untersuchen. Hierfür wurden am Tag 3 der AIA aus Lymphknoten und Milz Lymphozyten gewonnen und diese *in vitro* antigenspezifisch mit mBSA oder über immobilisierte anti-CD3-Antikörper restimuliert. Mittels ELISA konnten anschließend die Mengen der jeweiligen Zytokine bestimmt werden. Im direkten Vergleich der AIA-Kontrolltiere ist hierbei zu erkennen, dass stimulationsunabhängig IL-2 und IL-4 verstärkt in der Milz produziert werden, während IL-17, IFN $\gamma$  und TGF $\beta$  in größeren Mengen von den Zellen der Lymphknoten abgegeben werden. Die weiteren untersuchten Zytokine (IL-5, IL-6, IL-10, IL-21) waren nur in sehr geringen Mengen messbar. Die chemische Sympathektomie übt auf dieses Zytokinprofil einen umfassend hemmenden Einfluss aus. IL-17 wird dabei unabhängig von Stimulationstyp und Herkunft der Zellen signifikant verringert. Ebenso werden IFN $\gamma$ , IL-2 und IL-6 durch die Zellen der Lymphknoten sowie IL-2, IL-4 und IFN $\gamma$  nach antigenspezifischer Stimulation von den Lymphozyten der Milz in reduziertem Maße abgegeben. Weitestgehend unverändert bleiben trotz Sympathektomie die Mengen an IL-10 und IL-21 sowie der Gehalt an TGF $\beta$  in den Kulturüberständen der Lymphknoten-Zellsuspension.

Das Modell der AIA wird in erster Linie durch T-Helferzellen bzw. deren Zytokine vermittelt<sup>112,117</sup>. Aus diesem Grund kommt den oben genannten Veränderungen im Zytokinprofil eine besondere Bedeutung zu. Neben dem klassischen Th1/Th2-Schema rückten die Th17-Zellen zuletzt stark in den Fokus der Forschung. Ihnen

wird eine Hauptrolle im Entzündungsgeschehen bei Autoimmunkrankheiten zugeschrieben, was durch erhöhte Level von IL-17 in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten bekräftigt wird<sup>148,165</sup>. Eine Einflussnahme des SNS auf die Zytokinproduktion bei Entzündungsprozessen ist seit langem bekannt. In Abhängigkeit vom jeweiligen Stimulationstyp wurden hierbei allerdings auch gegenteilige Effekte beschrieben. Infolge der Sympathektomie konnte die Produktion der Th1-spezifischen pro-inflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN $\gamma$  sowohl stimuliert als auch gehemmt werden<sup>27,107</sup>. Ein direkter Zusammenhang zwischen SNS und Immunsystem, der sich über die Modulation der Zytokinantwort auf die klinischen Parameter auswirkt, scheint also auch im Fall der AIA zuzutreffen. In anderen tierexperimentellen Modellen wurde dies bereits belegt. Nach Sympathektomie konnten bei der CIA neben verminderten Schwellungswerten auch reduzierte Mengen an IL-17 gemessen werden<sup>59</sup>. IL-17 nimmt bei Arthritismodellen eine wichtige Funktion zur Entwicklung und Aufrechterhaltung der Erkrankung ein. So zeigen Mäuse, die für dieses Zytokin defizient sind, im Fall der CIA keine klinischen Symptome<sup>108</sup>. Dem entgegen gesetzt induziert die intraartikuläre Applikation von IL-17 bei der AIA die Migration von Neutrophilen in das Kniegelenk und stimuliert Makrophagen zur Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ <sup>68,118</sup>. Ebenso trägt es in der AIA durch die Aktivierung von synovialen Fibroblasten und Förderung der Osteoklastogenese zur Gelenkzerstörung bei<sup>66</sup>. Dieser pathogene Prozess wird durch die Regulierung der Entwicklung und Proliferation der Th17-Zellen von weiteren Zytokinen kontrolliert. Dabei tragen zum einen IL-6 und TGF $\beta$  begünstigend zur Th17-Differenzierung aus naiven Th-Zellen (Th0) bei und zum anderen halten IL-23 und IL-1 die Th17-geprägte Immunantwort aufrecht<sup>100,143</sup>. Diese Verknüpfung im Netzwerk der Immunmediatoren findet sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wieder. So wird die in Folge der Sympathektomie stark reduzierte Menge an IL-17 von einer verminderten Produktion an IL-6 in den Lymphknoten und TGF $\beta$  in der Milz begleitet. Ein Mechanismus, der den indirekten Zusammenhang zwischen SNS und IL-17 beschreibt, kann ebenso über den IL-6-Regelkreis aufgezeigt werden. Huang et al. wiesen in Ratten die Verknüpfung der Konzentrationen an Noradrenalin und IL-6 nach<sup>63</sup>. Dabei wurde die IL-6-Produktion von Lymphozyten in einem IL-1-vermittelten Signalweg durch die direkte Gabe von Noradrenalin erhöht und infolge der chemischen Sympathektomie gehemmt. Katecholamine können demnach die Menge an IL-17 mittelbar über IL-6 beeinflussen. In den Ergebnissen der Zytokinbestimmung war ebenfalls die verringerte Menge an IFN $\gamma$  bei den denervierten Tieren ersichtlich. Entgegen dem klassischen Bild eines pro-

inflammatorischen Th1-Zytokins bei der Immunantwort der RA wurde Interferon- $\gamma$  in den Modellen der AIA und CIA zuletzt anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben<sup>15</sup>. So entwickeln IFN $\gamma$ -defiziente Mäuse eine signifikant schwerere akute Kniegelenkschwellung, die im histologischen Bild mit einer verstärkten Infiltration von Neutrophilen einhergeht<sup>66,156</sup>. Dieser pathologische Prozess wird durch die gleichzeitig erhöhte Produktion von IL-17 vermittelt. Die Prostaglandin E<sub>2</sub>-bedingte Hemmung von IFN $\gamma$ , welche mit gesteigerter IL-17-Bildung verbunden ist, führte ebenso im Modell der CIA zu einem schwereren Arthritisverlauf und bestätigte die pro-inflammatorischen Eigenschaften dieses Zytokins<sup>86,136</sup>. Realisiert wird dieser Prozess über eine Verschiebung der IL-23/IL-12-Balance zugunsten des Th17-begünstigenden IL-23. Aufgrund dieser jüngsten Erkenntnisse hatte man in der vorliegenden Arbeit nicht mit einer gleichzeitigen Hemmung von IL-17 und IFN $\gamma$  gerechnet. Der Einfluss des SNS auf das durch Zytokine vermittelte Entzündungsgeschehen in der AIA muss demnach über den direkten Th1- und Th17-Signalweg hinausgehen. In anderen Tiermodellen konnte bereits ein verschiedenartiger neuroimmunologischer Effekt gezeigt werden. Bei der CIA ist der über noradrenerge Rezeptoren vermittelte Einfluss des SNS auf die IFN $\gamma$ -Sekretion von Th1-Zellen bimodaler Natur. So stimuliert Noradrenalin naive Vorläuferzellen zur Produktion dieses Zytokins, während bei generierten Effektorzellen eine Hemmung zu verzeichnen ist<sup>141</sup>. Bei der EAE (Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis) und in einem Listerien-Infektionsmodell wurde zudem die Abhängigkeit des Einflusses des SNS von IFN $\gamma$  dargelegt. Der normalerweise durch die Sympathektomie hervorgerufene und den Verlauf der Erkrankung verändernde Effekt wurde in IFN $\gamma$ -defizienten Tieren nicht beobachtet<sup>107,114</sup>. Eine neuroimmunologische Wirkung auf das Entzündungsgeschehen scheint demnach vom intakten Zytokinnetzwerk abhängig zu sein<sup>72</sup>.

Im Fall der AIA konnte diese Vermutung jedoch nicht bestätigt werden. Die Sympathektomie erzielte auch in IFN $\gamma$ -defizienten Mäusen eine anti-inflammatorische Wirkung. Entsprechend dem C57BL/6-Wildtyp wurde die Kniegelenkschwellung in der akuten Entzündungsphase durch die Denervation signifikant reduziert (Abb. 50 im Anhang). Der durch den Mangel an IFN $\gamma$  induzierte pro-inflammatorische Effekt in der AIA kann somit über das Fehlen noradrenerger Signale kompensiert werden.

Auch die Funktion der regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) wird vom Transmitter des SNS beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass T<sub>reg</sub> selbst erhebliche Mengen an Noradrenalin enthalten, welches bei seiner Freisetzung über auto- und parakrine Mechanismen die Synthese von IL-10 und TGF $\beta$  hemmt<sup>31</sup>. Diese Beeinträchtigung der T<sub>reg</sub> konnte am Modell der CIA bestätigt werden. So wurde in Zelltransfer-Experimenten der Arthritisverlauf verschlimmert, wenn die Zellen zuvor *in vitro* mit

Noradrenalin behandelt wurden<sup>59</sup>. Im Gegensatz hierzu wird die Schwere der CIA gemildert, wenn die transferierten T<sub>reg</sub> aus sympathektomierten Spendertieren stammen. Die direkte Einflussnahme des SNS auf die regulatorischen T-Zellen stellt somit einen weiteren Mechanismus dar, über den die Pathogenese der Arthritis beeinflusst werden kann.

Zusammenfassend lässt sich für die Immunparameter der akuten Phase der AIA herausstellen, dass die chemische Sympathektomie einen umfassend hemmenden Einfluss ausübt. Sowohl die humorale Immunantwort als auch die zellulären Effektormechanismen werden infolge der Denervation abgeschwächt. In Bezug auf die Zytokinproduktion der Lymphozyten finden dabei keine unilateralen Veränderungen statt. Vielmehr wird die Synthese der charakteristischen Mediatoren der Th1-, Th2- und Th17-Zellen insgesamt reduziert. Am stärksten ist dabei die Verringerung des Gehalts an IL-17 nach antigenspezifischer Stimulation. Bekräftigt durch die gleichzeitige Hemmung von IL-6, welches die Th17-Differenzierung maßgeblich begünstigt, stellt diese Veränderung den markantesten Effekt der Sympathektomie dar.

### **4.3 Der Einfluss der Adrenozeptoren auf die Immunparameter**

Durch die gezielte Beeinflussung der Signalübertragung des Sympathikus sollte untersucht werden, inwiefern Adrenozeptoren (AR) an der neuroimmunologischen Modulation im Verlauf der AIA beteiligt sind. Hierfür sollten durch die Behandlung mit Agonisten und Antagonisten (Blocker) des postganglionären Transmitters Noradrenalin Vergleiche zur chemischen Sympathektomie gezogen werden, um Rückschlüsse auf dessen Wirkmechanismus zu erhalten. Infolge der spezifischen Bindung an noradrenerge Rezeptoren imitieren dabei Agonisten die Wirkung des natürlichen Liganden, während Antagonisten die Signaltransduktion hemmen.

Es konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die systemische Applikation von  $\alpha$ - (Phentolamin) als auch  $\beta$ -Antagonisten (Propranolol) am Tag 0 vor dem Auslösen der AIA die Schwere der Kniegelenkschwellung signifikant senken kann, wobei die  $\beta$ -Blocker eine stärkere anti-inflammatorische Wirkung aufwiesen. Im direkten Vergleich der  $\beta$ -Subtypen stellten sich ab dem dritten Tag der akuten Phase die  $\beta_2$ -Blocker als deutlich effektiver heraus und ließen die Gelenkschwellung bis zum Beginn der chronischen Phase komplett abklingen. Dies entspricht der entzündungshemmenden Wirkung der Sympathektomie mit 6-Hydroxydopamin. Der durch das Fehlen von Noradrenalin induzierte anti-inflammatorische Effekt scheint demnach durch die ausbleibende Signaltransduktion über  $\beta$ -AR vermittelt zu sein. Die Behandlung zuvor neonatal sympathektomierter Tiere mit dem  $\beta$ -



Agonisten Isoproterenol am Tag 0 vor dem Auslösen der AIA kompensierte die Funktion des SNS und resultierte in erhöhten Entzündungsparametern. Sowohl die Werte der Gelenkschwellung als auch die Bewertung des histologischen Bildes zeigten die Aufhebung des anti-inflammatorischen Effektes der Sympathektomie an. Das SNS übt demnach in der akuten Phase der AIA eine pro-inflammatorische Wirkung aus, die über  $\beta$ -AR vermittelt wird.

Diese Ergebnisse werden durch die Befunde von Levine et al. aus den 1980er Jahren bestätigt. Am Modell der Adjuvans-Arthritis (AA) konnte dabei erstmals die Reduzierung der Entzündungsschwere und Knochenzerstörung infolge der Blockade von  $\beta$ -AR gezeigt werden<sup>88,89</sup>. Im Gegensatz zur Hemmung des SNS rief die Stimulation noradrenerger Rezeptoren durch den  $\beta_2$ -Agonisten Salbutamol jedoch unterschiedliche Effekte hervor. Während sich bei der AA der Krankheitsverlauf verschlimmerte, konnte bei der CIA eine mildere Schwere festgestellt werden<sup>88,98</sup>. Die Unterschiede im Protokoll der Modelle sowie der Zeitpunkt der Wirkstoffapplikation sind hierfür entscheidend. Besonderes Augenmerk gilt dem Bezug zum Antigenkontakt und Ausbruch der Erkrankung. So verschlimmert die Injektion des  $\beta_2$ -Agonisten zum Zeitpunkt der Adjuvans-Gabe im Fall der AA wie zuvor beschrieben die Entzündungsparameter, während eine spätere Behandlung bei Krankheitsbeginn anti-inflammatorisch wirkt<sup>94</sup>.

Zu den Zielstrukturen des SNS im Gelenk, die auf Katecholamine reagieren und den Verlauf der Arthritis beeinflussen können, zählen T-Zellen, Makrophagen, Mastzellen, synoviale Fibroblasten sowie Osteoblasten/-klasten. In welcher Art die Aktivität der Immunzellen dabei moduliert wird, hängt von deren Mikroumgebung ab. So sprechen beispielsweise Lymphozyten im entzündeten Gelenk anders auf die Signale des SNS an als in den sekundären lymphatischen Organen<sup>94</sup>. Inwieweit die Antagonisten und Agonisten der Adrenozeptoren im Modell der AIA Einfluss auf zellulärer Ebene nehmen können, sollte im Folgenden *in vitro* analysiert werden. Hierfür wurde die allgemeine Vitalität der Immunzellen, deren Proliferationsrate sowie die Zytokinproduktion untersucht. Während die  $\beta$ -Antagonisten eine von der Stimulationszeit abhängige zellschädigende Wirkung ähnlich dem 6-OHDA aufwiesen, wurde die Vitalität der Lymphozyten durch den  $\beta$ -Agonisten Isoproterenol nicht geschwächt. Ein ähnliches Bild ergaben die Ergebnisse des Proliferationsassays. Während Isoproterenol bei einer Dosis von 10  $\mu$ M stimulierend wirkte, zeigten die  $\beta$ -Antagonisten und 6-OHDA konzentrationsabhängig stark hemmende Eigenschaften. Des Weiteren konnte am Zytokinprofil der Lymphozyten gezeigt werden, dass sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine in ihrer Menge durch  $\beta$ -Antagonisten (Propranolol) und  $\beta$ -Agonisten (Isoproterenol) vermindert werden. Lediglich TGF $\beta$  nach Propranolol-

als auch IL-2 und IL-6 nach Isoproterenolbehandlung wurden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle leicht erhöht, während die übrigen Zytokinen (IL-4, IL-10, IL-17, IFN $\gamma$ ) reduziert wurden.

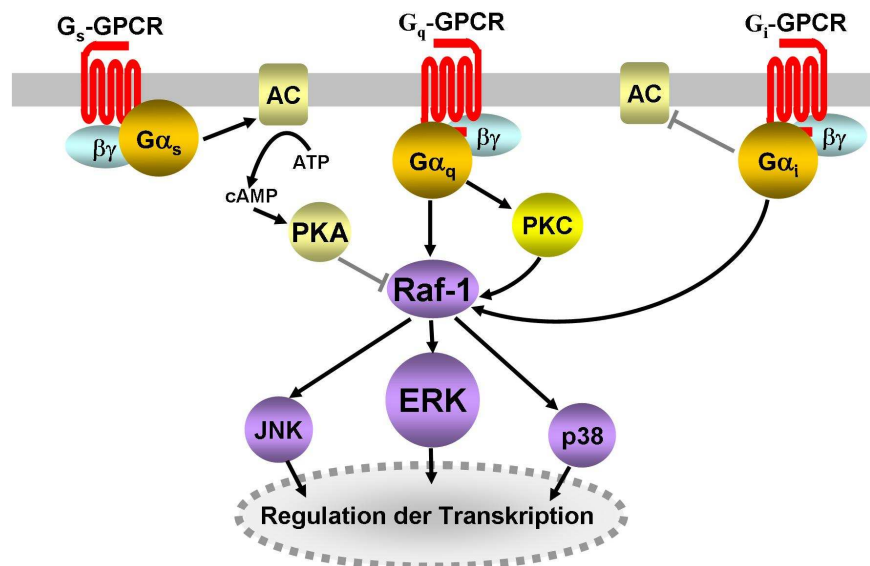
Die über  $\beta$ -AR vermittelte Signalübertragung des SNS übt demnach einen umfassenden Einfluss auf die Immunzellen der AIA aus. Die Ergebnisse aus Vitalitätstest, Proliferationsassay und Zytokinprofil zeigen dabei eine unterschiedliche Wirkung nach Hemmung oder Stimulation der noradrenergen Rezeptoren an. Entsprechend dem Effekt von 6-OHDA bei der chemischen Sympathektomie wird die Aktivität der Lymphozyten durch AR-Antagonisten ausnahmslos reduziert.  $\beta$ -Agonisten zeigen dem gegenüber konzentrationsabhängig auch pro-inflammatorische Eigenschaften. Eine Abhängigkeit der neuroimmunologischen Modulation von der Konzentration an Transmittern konnte bereits in Milzen arthritischer Mäuse belegt werden. So können im Fall der CIA  $\beta$ -adrenerge Effekte nur dann beobachtet werden, wenn sich das SNS in einem aktivierten Zustand befindet, gekennzeichnet durch die maximale Ausschüttung von Noradrenalin. Im Normalzustand des SNS mit geringer Transmitterfreisetzung werden demgegenüber nur  $\alpha$ -AR angesprochen, die wiederum andere immunmodulatorische Effekte bewirken<sup>70,141</sup>. Bezüglich des AR-vermittelten Einflusses auf die Zytokinproduktion der einzelnen Th-Subtypen lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse keine genaue Aussage treffen. Sowohl Th1- (IFN $\gamma$ ) als auch Th2- (IL-4) und Th17-typische Zytokine (IL-17) wurden durch Antagonisten sowie Agonisten reduziert. Im Fall von IFN $\gamma$  konnten damit jedoch Befunde von Sanders et al. an murinen T-Zellen bestätigt werden<sup>122</sup>. Abhängig vom Typ und Aktivitätszustand der untersuchten Zellen sowie den verwendeten Pharmaka variieren die beschriebenen Resultate dennoch in der Literatur. Die Zahl der  $\beta$ -Adrenozeptoren auf den Lymphozyten ist zudem zelltypspezifisch, wobei Th2-Zellen keine  $\beta_2$ -AR exprimieren<sup>42,122</sup>. Die beschriebenen Veränderungen in der Expression der Th2-Zytokine IL-4 und IL-6 müssen somit über andere AR-Subtypen vermittelt worden sein. Aktuelle Ergebnisse, die die klinische Bedeutung von Polymorphismen des  $\beta_2$ -AR-Gens hervorheben, werden in diesem Zusammenhang diskutiert. Demnach bestimmen Genvarianten, die Veränderungen in den Codons 16, 27 und 164 aufweisen, das durchschnittliche Alter der Patienten beim Ausbruch der RA und die Häufigkeit von kardiovaskulären Begleiterkrankungen<sup>26,99,133</sup>. Davon abgeleitet scheinen die Polymorphismen im Codon 16 die Dominanz des Typs der T-Helferzell-Antwort festzulegen<sup>161</sup>. Ein für die RA charakteristischer genetischer Hintergrund des  $\beta_2$ -AR ist somit wahrscheinlich direkt für das Immungeschehen mit verantwortlich. Die komplexe Interaktion zwischen autonomen Nervensystem und Immunsystem bei der RA wird damit bekräftigt.

Makrophagen, die im Pathogeneseprozess der AIA eine wichtige Rolle spielen, stehen ebenfalls unter der Kontrolle des SNS. In einem murinen Infektionsmodell mit *Listeria monocytogenes* konnte mittels chemischer Sympathektomie ein anti-inflammatorischer Effekt induziert werden, der in den ersten Tagen der Infektion durch eine verminderte Bakterienzahl bei gleichzeitig erhöhter Menge an Peritonealmakrophagen gekennzeichnet war<sup>120</sup>. Inwieweit die Modulation der Zellaktivität über die Adrenozeptoren vermittelt wird, sollte im Folgenden untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge des produzierten Stickoxids, welches als Maß für den Aktivitätszustand der Makrophagen steht, *in vitro* durch die Antagonisten der Subtypen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  sowie durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Agonisten signifikant reduziert wird. Das Neurotoxin 6-OHDA erzielt dieselbe hemmende Wirkung, allerdings in weit stärkerem Ausmaß. Die Dauer der jeweiligen Behandlung, jedoch nicht die Art der Zellstimulation (LPS/IFN $\gamma$ ), ist hierbei mitbestimmend. Im Zytokinprofil lässt sich herausstellen, dass 6-OHDA lediglich die Menge der pro-inflammatorischen Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) reduzieren kann<sup>75</sup>. Die anti-inflammatorisch bzw. regulatorisch wirkenden Zytokine IL-10, IL-12 und TGF $\beta$  bleiben gegenüber der unbehandelten Kontrolle unverändert<sup>155</sup>. Die Behandlung mit  $\beta$ -Antagonisten erzielt indes gegenteilige Effekte. So werden IL-10 und IL-12 reduziert, während IL-1 $\beta$  und IL-6 durch den  $\beta_2$ -Antagonisten Butoxamin verstärkt gebildet wird. Ebenso können die  $\beta$ -Agonisten das Zytokinprofil der Makrophagen beeinflussen. So wird IL-6 erhöht, während IL-10 sowie IL-12 vermindert werden. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und TGF $\beta$  bleiben unverändert.

Zusammenfassend lässt sich als Gemeinsamkeit herausstellen, dass die Modulation der  $\beta$ -AR-vermittelten Signalübertragung die Menge des pro-inflammatorischen IL-6 erhöht und die von regulatorisch wirkendem IL-10 und IL-12 senkt. Im Gegensatz hierzu werden die pro-inflammatorischen Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) durch den direkten Kontakt mit dem Neurotoxin 6-OHDA vermindert.

Auch hierzu variieren die Angaben in der Literatur. In den meisten Fällen wird von einer Reduzierung der entzündungsfördernden Mediatoren IL-6 und TNF $\alpha$  berichtet, unabhängig ob die Aktivität des SNS hemmend oder stimulierend verändert wurde<sup>60,115,146</sup>. Die Abgabe von IL-10 hingegen wird sowohl durch Noradrenalin direkt als auch über  $\beta$ -Agonisten verstärkt<sup>142</sup>. Neben der Vielfalt an Substanzen, welche die Aktivität des SNS bzw. die adrenerge Signalübertragung beeinflussen, scheint auch die Art der Zellstimulation ein Grund für die unterschiedlichen neuroimmunologischen Effekte zu sein. Szelenyi et al. konnten bei Isoproterenol-behandelten Makrophagen infolge der Stimulation mit LPS eine anti-inflammatorische bzw. mit PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) eine pro-

inflammatorische Wirkung auf der Ebene der TNF $\alpha$ -Expression nachweisen<sup>97,145</sup>. Dabei wird die veränderte Zytokinproduktion von einer Aktivierung (Phosphorylierung) der ERK1/2 (Extracellular-signal Regulated Kinasen) und p38-MAP-Kinasen (MAP, Mitogen-Activated Protein) begleitet. Diese Proteine sind an der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion beteiligt und belegen durch ihre veränderte Phosphorylierung modifizierte Effektorfunktionen bei der Immunantwort. Als Ursache wird hierfür ein Wechsel der GPCR-Untereinheiten (G-Protein-gekoppelter Rezeptor) von  $G_s$  zu  $G_i$  angenommen.  $G_s$  und  $G_i$  beschreiben hierbei funktionelle Klassen der GPCR, die stimulatorisch ( $G_s$ ) bzw. inhibitorisch ( $G_i$ ) wirken. Während  $G_s$ -Proteine die Bildung des Second-Messengers cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) fördern und somit die Proteinkinase A aktivieren, verringern  $G_i$ -Proteine die Konzentration an intrazellulärem cAMP (siehe Abb. 48).



#### Abb. 48 G-Protein-vermittelter MAPK-Signaltransduktionsweg

Die  $\alpha$ -Untereinheiten der GPCR aktivieren oder hemmen die AC, welche die Synthese des ‚Second Messenger‘ cAMP katalysiert. cAMP wiederum aktiviert die Proteinkinase A. Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) JNK, ERK und p38, die die Transkription der Zielgene regulieren, werden, vermittelt über Raf-1, durch PKC aktiviert und durch PKA gehemmt. Die Klasse des GPCR ( $G_s$ ,  $G_q$ ,  $G_i$ ), an die der *First Messenger* bindet, ist somit entscheidend für die nachfolgende Effektorfunktion.

AC, Adenylylcyclase; ATP, Adenosintriphosphat; cAMP, cyclisches Adenosinmonophosphat; ERK, Extracellular-signal regulated Kinase; GPCR, G-Protein-gekoppelter Rezeptor; JNK, c-Jun N-terminale Kinase; PKA, Proteinkinase A; PKC, Proteinkinase C; Raf, Rapidly growing fibrosarcoma.

(modifiziert nach New & Wong, 2007<sup>110</sup>)

Die  $G_i$ -bedingte Änderung des  $Ca^{2+}/K^+$ -Ionenaustausch erschwert zudem die Depolarisation der Zelle und die Frequenz der Aktionspotenziale nimmt ab.  $\beta$ -AR, die molekularbiologisch als GPCR angesehen werden, sind in ihrer Signalübertragung klassisch  $G_s$ -spezifisch und zeigen durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation einen Wechsel zur  $G_i$ -gekoppelten Transduktion<sup>34</sup>. Somit wird die über das SNS vermittelte Änderung der Immunantwort durch den stimulusabhängigen Wandel der G-Protein-gekoppelten Informationsweiterleitung bedingt.

#### **4.4 Das nozizeptive Verhalten im Verlauf der AIA**

Der Gelenkschmerz stellt ein bedeutendes klinisches Problem dar, von dem ein Fünftel der europäischen Bevölkerung betroffen ist<sup>22</sup>. Neben traumatischen Verletzungen und Bandscheibenvorfällen stellen die rheumatoide Arthritis und die Osteoarthritis in 42 % aller Fälle die hauptsächliche Ursache dar. Der Großteil der Patienten erhält dabei keine spezielle schmerzrelevante Behandlung, wodurch die Lebensqualität negativ beeinflusst wird. Da der Schmerz im Gelenk oft dumpf und schlecht lokalisierbar ist, sind die neuronalen Grundlagen bis dato nicht genau geklärt<sup>125</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde die sekundäre Hyperalgesie auf mechanische und thermische Reize im Verlauf der AIA gemessen. Es sollte untersucht werden, inwieweit das nozizeptive Verhalten mit dem Entzündungsverlauf einher geht und durch die chemische Sympathektomie beeinflusst werden kann.

In der akuten Phase der AIA wiesen die Versuchstiere eine ausgeprägte sekundäre Hyperalgesie an der arthritischen Extremität auf. Die Latenzzeit bis zum Zurückziehen der Pfote wurde am Tag 1 nach dem Auslösen für mechanische Stimuli um ~20% und für thermische Stimuli um ~40% gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren verringert. Die erhöhte Schmerzempfindlichkeit für mechanische Reize klingt dabei analog dem Verlauf der Gelenkschwellung bis zum Beginn der chronischen AIA-Phase (d7) wieder ab, während die hyperalgetische Reaktion infolge thermischer Stimulation bis über den siebenten Tag hinaus bestehen bleibt. Der binnen kurzer Zeit induzierte entzündungsbedingte Schmerz ist in erster Linie auf eine periphere Sensibilisierung zurückzuführen. Die vom Gelenk ausgehenden afferenten Nervenfasern ( $A\beta$ ,  $A\delta$ , C) zeigen dabei eine erhöhte Antwort auf den Grad der Stimulation und eine niedrigere Schwelle ihrer Erregbarkeit<sup>128</sup>. Die im vorliegenden AIA-Modell gemessene sekundäre Hyperalgesie wird dagegen vermutlich über den Prozess der zentralen Sensibilisierung erklärt<sup>16</sup>. Diese entfernt vom entzündeten Gelenk auftretende verstärkte Empfindlichkeit wird durch die Entwicklung einer erhöhten Reizbarkeit der

Rückenmarksneurone hervorgerufen<sup>167</sup>. Die im Vergleich zur Reaktion auf mechanische Stimuli länger anhaltende thermische Hyperalgesie stellt dabei ein bekanntes Phänomen dar. Eine mögliche Bedeutung für den menschlichen Organismus ist bislang jedoch unbekannt<sup>16</sup>. Entsprechend den Ergebnissen in der primären Entzündungsphase wird die Korrelation zwischen dem Grad der Gelenkschwellung und der Schmerzempfindlichkeit auf mechanische Reize auch in der Flare-up-Reaktion ersichtlich. Gemäß der massiveren Entzündungsreaktion infolge des erneuten Antigenkontaktes ist auch eine stärkere Verringerung der Latenzzeit (~30%) bei den Versuchstieren zu beobachten. Dies bekräftigt erneut den direkten Zusammenhang zwischen Entzündung und nozizeptivem Verhalten.

Im Folgenden wurde nun der Einfluss der chemischen Sympathektomie auf die Schmerzwahrnehmung untersucht. Hierbei weisen die systemisch (intraperitoneal) mit 6-Hydroxydopamin sympathektomierten Tiere im Vergleich zu den AIA-Kontrollen eine in der akuten Entzündungsphase signifikant erhöhte Latenzzeit bis zum Zurückziehen der Pfote auf. Dies konnte sowohl für mechanische als auch thermische Stimuli beschrieben werden. Die sympathektomierten Mäuse zeigten demnach eine weniger stark ausgeprägte sekundäre Hyperalgesie. In der chronischen Entzündungsphase wurde ähnlich wie bei den unbehandelten AIA-Tieren kein Unterschied zur Baseline (gemittelte Messwerte vor dem Auslösen der AIA) bzw. zu den naiven Kontrolltieren mehr dokumentiert. Diese Resultate gehen mit der Einflussnahme der systemischen Sympathektomie auf den Verlauf der Gelenkschwellung einher. Um hierfür einen kausalen Zusammenhang aufzuzeigen, wurde die Sympathektomie als Kontrolle zum einen bei naiven Tieren systemisch und zum anderen bei AIA-Tieren lokal (intraartikulär) durchgeführt. In beiden Fällen konnte der schmerzlindernde Effekt der Sympathektomie nicht bestätigt werden. Die Messwerte der Latenzzeit entsprachen für beide Reizarten jeweils denen der unbehandelten Kontrollen. Der Einfluss des SNS auf das nozizeptive Verhalten ist demnach über dessen Vermögen, das Entzündungsgeschehen zu modifizieren, erklärbar. Ein milderer Verlauf der Arthritis bedingt somit die reduzierte Schmerzempfindlichkeit.

Dieser Zusammenhang konnte zuletzt auch von Pinto et al. am Modell der AIA bestätigt werden. Es wurde dabei gezeigt, dass die lokale (i.a.) Applikation des pro-inflammatorischen Zytokins IL-17 zum einen eine mechanische Hyperalgesie und zum anderen die Freisetzung einer Reihe entzündungsfördernder Mediatoren (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL1) induziert. Gleichzeitig konnte dieser hyperalgetische Effekt von IL-17 in TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen bzw. durch die Vorbehandlung mit Antagonisten vom IL-1-Rezeptor und CXCR1/2 aufgehoben werden<sup>118</sup>. Die Einflussnahme auf das nozizeptive Verhalten bei akuten Entzündungsreaktionen ist demnach von einer

Kaskade pro-inflammatorischer Botenstoffe abhängig. Eine direkte Wirkung auf die Schmerzwahrnehmung konnte auch für andere Entzündungsmediatoren nachgewiesen werden. So ist eine Sensibilisierung der Nervenfasern ebenso durch Bradykinin, Prostaglandin E<sub>2</sub>, Serotonin, Substanz P und Neuropeptid Y möglich<sup>104</sup>. Gleichmaßen ist dies neben den erwähnten Zytokinen IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-17 auch durch IL-6, IL-18 oder IL-33 möglich<sup>26,46,65,118,158,160</sup>.

## **4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Die Einflussnahme des Nervensystems auf Autoimmunkrankheiten ist bereits in mehreren Tiermodellen der rheumatoiden Arthritis belegt worden. In der vorliegenden Arbeit sollte gezielt die Rolle des SNS im Verlauf der AIA an der Maus untersucht werden. Hierfür wurde die Abhängigkeit verschiedener Entzündungsparameter von der Signalübertragung des Sympathikus analysiert.

Zusammenfassend kann aufgrund dieser Ergebnisse geschlussfolgert werden, dass das SNS einen umfassend pro-inflammatorischen Einfluss auf die akute Phase der AIA ausübt. Infolge der systemischen Sympathektomie zum Zeitpunkt des Auslösens der Entzündungsreaktion wurden sowohl die Stärke der Kniegelenkschwellung als auch der Grad der zellulären Infiltration ins Gelenk, die synoviale Hyperplasie sowie die molekularen Immunparameter signifikant reduziert. Diese Veränderungen konnten ebenfalls in der akuten Flare-up-Reaktion, jedoch nicht in der chronischen Phase beobachtet werden. Die Bedeutung des Zeitpunktes der Denervation wird durch die ausbleibende anti-inflammatorische Wirkung der Sympathektomie während der Immunisierungsphase bzw. in der symptomatischen Phase belegt.

Sowohl die Effektormechanismen der humoralen als auch der zellulären Immunabwehr werden vom SNS beeinflusst. Die Verringerung der Th1-vermittelten antigenspezifischen Immunglobuline IgG2a und IgG2b nach der Sympathektomie sowie das Zytokinprofil der Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten verdeutlichen dies. Hierbei wird in überdurchschnittlichem Maß die Menge an IL-17 reduziert. Während der Gehalt der entzündungshemmenden Mediatoren IL-10 und TGF $\beta$  weitestgehend unverändert bleibt, werden die Th1- (IL-2, IFN $\gamma$ ) als auch Th2-spezifischen (IL-4) Zytokine reduziert. Der Fokus der neuroimmunologischen Modulation des Entzündungsgeschehens scheint demnach auf der Th17-vermittelten Signalkaskade zu liegen. Die herabgesetzte Menge des zur Th17-Differenzierung benötigten IL-6 bekräftigt diese Annahme.

Inwieweit die Einflussnahme des SNS über die Adrenozeptoren der Immunzellen vermittelt wird, konnte *in vitro* an Lymphozyten und Makrophagen gezeigt werden. Anhand von Untersuchungen, die die Vitalität dieser Zellen beschreiben, konnten dabei zellschädigende und aktivitätshemmende Eigenschaften für Noradrenalin-Antagonisten, spezifisch für  $\beta_2$ -Adrenozeptoren, aufgezeigt werden. Diese Befunde konnten *in vivo* durch die Modulation der klinischen Symptome bestätigt werden. Im Modell der AIA ist der anti-inflammatorische Effekt der chemischen Sympathektomie von daher aller Voraussicht nach zum Teil über die ausbleibende  $\beta$ -AR-vermittelte Signaltransduktion zu erklären.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit bekräftigen somit die Annahme, dass die Wechselwirkung zwischen Immun- und Nervensystem eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis einnehmen kann. Das SNS nimmt dabei sowohl in den sekundären lymphatischen Organen als auch im Gelenk Einfluss auf die Immunantwort. Zudem wird die Vorstellung, durch gezielte Beeinflussung des SNS einen möglichen neuen Therapieansatz zu etablieren, bestätigt. Hierfür sind jedoch noch umfangreiche fortführende Untersuchungen nötig. Um eine therapeutische Behandlung zu ermöglichen, müssen beispielsweise die Mechanismen der Chronifizierung sowie deren molekularbiologische Grundlagen, die die ausbleibende Einflussnahme des SNS auf den chronischen Verlauf der AIA erklären, analysiert werden.



## 5. Literaturverzeichnis

- 1 Acheson, A.L., Zigmond, M.J. & Stricker, E.M. Compensatory increase in tyrosine hydroxylase activity in rat brain after intraventricular injections of 6-hydroxydopamine. *Science* 1980, 207(4430), 537-540.
- 2 Ackerman, K.D., Madden, K.S., Livnat, S., Felten, S.Y. & Felten, D.L. Neonatal sympathetic denervation alters the development of in vitro spleen cell proliferation and differentiation. *Brain Behav Immun* 1991, 5(3), 235-261.
- 3 Albani, S., Keystone, E.C., Nelson, J.L., Ollier, W.E., La Cava, A., Montemayor, A.C., Weber, D.A., Montecucco, C., Martini, A. & Carson, D.A. Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1995, 1(5), 448-452.
- 4 Andersson, A.K., Li, C. & Brennan, F.M. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008, 10(2), 204.
- 5 Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., McShane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.A., Kaplan, S.R., Liang, M.H., Luthra, H.S. & et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988, 31(3), 315-324.
- 6 Baerwald, C., Graefe, C., von Wichert, P. & Krause, A. Decreased density of beta-adrenergic receptors on peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1992, 19(2), 204-210.
- 7 Baeten, D., Peene, I., Union, A., Meheus, L., Sebbag, M., Serre, G., Veys, E.M. & De Keyser, F. Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium: relevance to antifilaggrin autoantibodies. *Arthritis Rheum* 2001, 44(10), 2255-2262.
- 8 Bang, H., Mollenhauer, J., Schulmeister, A., Nager, C., van Eden, W., Wand-Wurtenberger, A., Kaufmann, S.H. & Brune, K. Isolation and characterization of a cartilage-specific membrane antigen (CH65): comparison with cytokeratins and heat-shock proteins. *Immunology* 1994, 81(2), 322-329.
- 9 Bear, M., Connors, B.W., Paradiso, M.A. *Neurowissenschaften*, Spektrum, 2009.
- 10 Bellinger, D.L., Lorton, D., Hamill, R.W., Felten, S.Y. & Felten, D.L. Acetylcholinesterase staining and choline acetyltransferase activity in the young adult rat spleen: lack of evidence for cholinergic innervation. *Brain Behav Immun* 1993, 7(3), 191-204.
- 11 Bellinger, D.L., Millar, B.A., Perez, S., Carter, J., Wood, C., ThyagaRajan, S., Molinaro, C., Lubahn, C. & Lorton, D. Sympathetic modulation of immunity: relevance to disease. *Cell Immunol* 2008, 252(1-2), 27-56.
- 12 Bendele, A. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001, 1(4), 377-385.
- 13 Billes, S.K. & Cowley, M.A. Inhibition of dopamine and norepinephrine reuptake produces additive effects on energy balance in lean and obese mice. *Neuropsychopharmacology* 2007, 32(4), 822-834.

- 14 Billes, S.K. & Cowley, M.A. Catecholamine reuptake inhibition causes weight loss by increasing locomotor activity and thermogenesis. *Neuropsychopharmacology* 2008, 33(6), 1287-1297.
- 15 Billiau, A. & Matthys, P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009, 20(2), 97-113.
- 16 Böttger, M.K., Hensellek, S., Richter, F., Gajda, M., Stöckigt, R., von Banchet, G.S., Bräuer, R. & Schaible, H.G. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum* 2008, 58(8), 2368-2378.
- 17 Böttger, M.K., Weber, K., Grossmann, D., Gajda, M., Bauer, R., Bar, K.J., Schulz, S., Voss, A., Geis, C., Bräuer, R. & Schaible, H.G. Spinal tumor necrosis factor alpha neutralization reduces peripheral inflammation and hyperalgesia and suppresses autonomic responses in experimental arthritis: a role for spinal tumor necrosis factor alpha during induction and maintenance of peripheral inflammation. *Arthritis Rheum* 2010, 62(5), 1308-1318.
- 18 Boom, W.H., Liano, D. & Abbas, A.K. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. II. Effects of interleukin 4- and interleukin 2-producing T cell clones on resting B lymphocytes. *J Exp Med* 1988, 167(4), 1350-1363.
- 19 Brackertz, D., Mitchell, G.F. & Mackay, I.R. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 1977, 20(3), 841-850.
- 20 Brackertz, D., Mitchell, G.F., Vadas, M.A. & Mackay, I.R. Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments. *J Immunol* 1977, 118(5), 1645-1648.
- 21 Brackertz, D., Mitchell, G.F., Vadas, M.A., Mackay, I.R. & Miller, J.F. Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *J Immunol* 1977, 118(5), 1639-1644.
- 22 Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R. & Gallacher, D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 2006, 10(4), 287-333.
- 23 Brenn, D., Richter, F. & Schaible, H.G. Sensitization of unmyelinated sensory fibers of the joint nerve to mechanical stimuli by interleukin-6 in the rat: an inflammatory mechanism of joint pain. *Arthritis Rheum* 2007, 56(1), 351-359.
- 24 Brennan, F.M. & McInnes, I.B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2008, 118(11), 3537-3545.
- 25 Brustolim, D., Ribeiro-dos-Santos, R., Kast, R.E., Altschuler, E.L. & Soares, M.B. A new chapter opens in anti-inflammatory treatments: the antidepressant bupropion lowers production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in mice. *Int Immunopharmacol* 2006, 6(6), 903-907.
- 26 Busjahn, A., Li, G.H., Faulhaber, H.D., Rosenthal, M., Becker, A., Jeschke, E., Schuster, H., Timmermann, B., Hoehe, M.R. & Luft, F.C. beta-2 adrenergic receptor gene variations, blood pressure, and heart size in normal twins. *Hypertension* 2000, 35(2), 555-560.

- 27 Callahan, T.A. & Moynihan, J.A. Contrasting pattern of cytokines in antigen- versus mitogen-stimulated splenocyte cultures from chemically denervated mice. *Brain Behav Immun* 2002, 16(6), 764-773.
- 28 Clauw, D.J. & Witter, J. Pain and rheumatology: thinking outside the joint. *Arthritis Rheum* 2009, 60(2), 321-324.
- 29 Coderre, T.J., Basbaum, A.I., Dallman, M.F., Helms, C. & Levine, J.D. Epinephrine exacerbates arthritis by an action at presynaptic B2-adrenoceptors. *Neuroscience* 1990, 34(2), 521-523.
- 30 Coderre, T.J., Basbaum, A.I., Helms, C. & Levine, J.D. High-dose epinephrine acts at alpha 2-adrenoceptors to suppress experimental arthritis. *Brain Res* 1991, 544(2), 325-328.
- 31 Cosentino, M., Fietta, A.M., Ferrari, M., Rasini, E., Bombelli, R., Carcano, E., Saporiti, F., Meloni, F., Marino, F. & Lecchini, S. Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood* 2007, 109(2), 632-642.
- 32 Courtenay, J.S., Dallman, M.J., Dayan, A.D., Martin, A. & Mosedale, B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 1980, 283(5748), 666-668.
- 33 Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Valerio, D.A., Guerrero, A.T., Nogueira, L.G., Vieira, S.M., Souza, D.G., Teixeira, M.M., Poole, S., Ferreira, S.H. & Cunha, F.Q. Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. *Eur J Pain* 2008, 12(8), 1059-1068.
- 34 Daaka, Y., Luttrell, L.M. & Lefkowitz, R.J. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 1997, 390(6655), 88-91.
- 35 Dalton, D.K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.S., Bradley, A. & Stewart, T.A. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 1993, 259(5102), 1739-1742.
- 36 del Rey, A., Wolff, C., Wildmann, J., Randolph, A., Hahnel, A., Besedovsky, H.O. & Straub, R.H. Disrupted brain-immune system-joint communication during experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2008, 58(10), 3090-3099.
- 37 Dickens, C., McGowan, L., Clark-Carter, D. & Creed, F. Depression in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Psychosom Med* 2002, 64(1), 52-60.
- 38 Ding, A.H., Nathan, C.F. & Stuehr, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988, 141(7), 2407-2412.
- 39 Donnerer, J., Amann, R. & Lembeck, F. Neurogenic and non-neurogenic inflammation in the rat paw following chemical sympathectomy. *Neuroscience* 1991, 45(3), 761-765.
- 40 Edwards, J.C., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, D.R., Stevens, R.M. & Shaw, T. Efficacy of B-cell-targeted therapy with

- rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004, 350(25), 2572-2581.
- 41 Egerer, K., Feist, E. & Burmester, G.R. The serological diagnosis of rheumatoid arthritis: antibodies to citrullinated antigens. *Dtsch Arztebl Int* 2009, 106(10), 159-163.
- 42 Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Chrousos, G.P. & Vizi, E.S. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000, 52(4), 595-638.
- 43 Engler, K.L., Rudd, M.L., Ryan, J.J., Stewart, J.K. & Fischer-Stenger, K. Autocrine actions of macrophage-derived catecholamines on interleukin-1 beta. *J Neuroimmunol* 2005, 160(1-2), 87-91.
- 44 Fedele, G., Stefanelli, P., Spensieri, F., Fazio, C., Mastrantonio, P. & Ausiello, C.M. Bordetella pertussis-infected human monocyte-derived dendritic cells undergo maturation and induce Th1 polarization and interleukin-23 expression. *Infect Immun* 2005, 73(3), 1590-1597.
- 45 Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J. & Pelletier, J.P. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002, 39(1-2), 237-246.
- 46 Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B., Bristow, A.F. & Poole, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature* 1988, 334(6184), 698-700.
- 47 Firestein, G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003, 423(6937), 356-361.
- 48 Fox, R.I. Mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug. *Semin Arthritis Rheum* 1993, 23(2 Suppl 1), 82-91.
- 49 Gabay, C. & McInnes, I.B. The biological and clinical importance of the 'new generation' cytokines in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009, 11(3), 230.
- 50 Gabriel, S.E., Crowson, C.S., Kremers, H.M., Doran, M.F., Turesson, C., O'Fallon, W.M. & Matteson, E.L. Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum* 2003, 48(1), 54-58.
- 51 Gifford, G.E. & Lohmann-Matthes, M.L. Gamma interferon priming of mouse and human macrophages for induction of tumor necrosis factor production by bacterial lipopolysaccharide. *J Natl Cancer Inst* 1987, 78(1), 121-124.
- 52 Glant, T.T., Mikecz, K., Arzoumanian, A. & Poole, A.R. Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. *Arthritis Rheum* 1987, 30(2), 201-212.
- 53 Gordon, S.L., Quinsey, N.S., Dunkley, P.R. & Dickson, P.W. Tyrosine hydroxylase activity is regulated by two distinct dopamine-binding sites. *J Neurochem* 2008, 106(4), 1614-1623.
- 54 Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. & Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982, 126(1), 131-138.

- 55 Gregersen, P.K., Silver, J. & Winchester, R.J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987, 30(11), 1205-1213.
- 56 Hardy, J.D., Wolff, H.G. & Goodell, H. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J Clin Invest* 1950, 29(1), 115-140.
- 57 Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. & Joris, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988, 32(1), 77-88.
- 58 Härle, P., Möbius, D., Carr, D.J., Schölmerich, J. & Straub, R.H. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005, 52(4), 1305-1313.
- 59 Härle, P., Pongratz, G., Albrecht, J., Turner, I.H. & Straub, R.H. An early sympathetic nervous system influence exacerbates collagen-induced arthritis via CD4+CD25+ cells. *Arthritis Rheum* 2008, 58(8), 2347-2355.
- 60 Hasko, G., Nemeth, Z.H., Szabo, C., Zsilla, G., Salzman, A.L. & Vizi, E.S. Isoproterenol inhibits IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Brain Res Bull* 1998, 45(2), 183-187.
- 61 Herbert, M.K. & Holzer, P. [Neurogenic inflammation. I. Basic mechanisms, physiology and pharmacology]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2002, 37(6), 314-325.
- 62 Hildebrand, C., Oqvist, G., Brax, L. & Tuisku, F. Anatomy of the rat knee joint and fibre composition of a major articular nerve. *Anat Rec* 1991, 229(4), 545-555.
- 63 Huang, Q.H., Takaki, A. & Arimura, A. Central noradrenergic system modulates plasma interleukin-6 production by peripheral interleukin-1. *Am J Physiol* 1997, 273(2 Pt 2), R731-738.
- 64 Hunneyball, I.M., Crossley, M.J. & Spowage, M. Pharmacological studies of antigen-induced arthritis in BALB/c mice. II. The effects of second-line antirheumatic drugs and cytotoxic agents on the histopathological changes. *Agents Actions* 1986, 18(3-4), 394-400.
- 65 Inglis, J.J., Notley, C.A., Essex, D., Wilson, A.W., Feldmann, M., Anand, P. & Williams, R. Collagen-induced arthritis as a model of hyperalgesia: functional and cellular analysis of the analgesic actions of tumor necrosis factor blockade. *Arthritis Rheum* 2007, 56(12), 4015-4023.
- 66 Irmeler, I.M., Gajda, M. & Bräuer, R. Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. *J Immunol* 2007, 179(9), 6228-6236.
- 67 Ishigami, T. The influence of psychic acts on the progress of pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. Tuberc.* 1919, 2, 470-484.
- 68 Jovanovic, D.V., Di Battista, J.A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F.C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F. & Pelletier, J.P. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 1998, 160(7), 3513-3521.

- 69 Kasahara, K., Tanaka, S. & Hamashima, Y. Suppressed immune response to T-cell dependent antigen in chemically sympathectomized mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1977, 18(3), 533-542.
- 70 Kees, M.G., Pongratz, G., Kees, F., Scholmerich, J. & Straub, R.H. Via beta-adrenoceptors, stimulation of extrasplenic sympathetic nerve fibers inhibits lipopolysaccharide-induced TNF secretion in perfused rat spleen. *J Neuroimmunol* 2003, 145(1-2), 77-85.
- 71 Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D. & Kollias, G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J* 1991, 10(13), 4025-4031.
- 72 Kelchtermans, H., Billiau, A. & Matthys, P. How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check. *Trends Immunol* 2008, 29(10), 479-486.
- 73 Kidd, B.L., Langford, R.M. & Wodehouse, T. Arthritis and pain. Current approaches in the treatment of arthritic pain. *Arthritis Res Ther* 2007, 9(3), 214.
- 74 Kin, N.W. & Sanders, V.M. It takes nerve to tell T and B cells what to do. *J Leukoc Biol* 2006, 79(6), 1093-1104.
- 75 Kinne, R.W., Stuhl Müller, B. & Burmester, G.R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res Ther* 2007, 9(6), 224.
- 76 Klareskog, L., Stolt, P., Lundberg, K., Kallberg, H., Bengtsson, C., Grunewald, J., Ronnelid, J., Harris, H.E., Ulfgren, A.K., Rantapaa-Dahlqvist, S., Eklund, A., Padyukov, L. & Alfredsson, L. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 2006, 54(1), 38-46.
- 77 Koch, M. <http://www.schmerzliga.de>. *Deutsche Schmerzliga e.V.*, 2006.
- 78 Kohm, A.P. & Sanders, V.M. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. *Pharmacol Rev* 2001, 53(4), 487-525.
- 79 Kouskoff, V., Korganow, A.S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C. & Mathis, D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 1996, 87(5), 811-822.
- 80 Kraan, M.C., Haringman, J.J., Weedon, H., Barg, E.C., Smith, M.D., Ahern, M.J., Smeets, T.J., Breedveld, F.C. & Tak, P.P. T cells, fibroblast-like synoviocytes, and granzyme B+ cytotoxic cells are associated with joint damage in patients with recent onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004, 63(5), 483-488.
- 81 Krüger, K. 4. Rheumatologie-Update-Seminar Wiesbaden. Praxiszentrum St. Bonifatius München edn <http://www.vetcontact.com/de/art.php?a=3914&t=>, 2009.
- 82 Krüger, K. 4. Rheumatologie-Update-Seminar Wiesbaden. <http://www.aerztezeitung.de/?sid=538848>, 2009.
- 83 Kruszewska, B., Felten, S.Y. & Moynihan, J.A. Alterations in cytokine and antibody production following chemical sympathectomy in two strains of mice. *J Immunol* 1995, 155(10), 4613-4620.

- 84 Kuhn, K.A., Kulik, L., Tomooka, B., Braschler, K.J., Arend, W.P., Robinson, W.H. & Holers, V.M. Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest* 2006, 116(4), 961-973.
- 85 Langford, L.A. & Schmidt, R.F. Afferent and efferent axons in the medial and posterior articular nerves of the cat. *Anat Rec* 1983, 206(1), 71-78.
- 86 Lemos, H.P., Grespan, R., Vieira, S.M., Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Fernandes, K.S., Souto, F.O., McInnes, I.B., Ferreira, S.H., Liew, F.Y. & Cunha, F.Q. Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN $\gamma$  production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106(14), 5954-5959.
- 87 Lens, J.W., van den Berg, W.B. & van de Putte, L.B. Flare-up of antigen-induced arthritis in mice after challenge with intravenous antigen: studies on the characteristics of and mechanisms involved in the reaction. *Clin Exp Immunol* 1984, 55(2), 287-294.
- 88 Levine, J.D., Coderre, T.J., Helms, C. & Basbaum, A.I. Beta 2-adrenergic mechanisms in experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85(12), 4553-4556.
- 89 Levine, J.D., Dardick, S.J., Roizen, M.F., Helms, C. & Basbaum, A.I. Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. *J Neurosci* 1986, 6(12), 3423-3429.
- 90 Lisitsyna, T., Veltishchev, D.U., Seravina, O.F., Kovalevskaya, O.B., Zeltyn, A.E., Fofanova, Y.S., Nasonov, E.L. Prevalence of psychiatric disorders in rheumatoid arthritis patients. in EULAR Congress State Institute of Rheumatology RAMS; Moscow Research Institute of Psychiatry, Copenhagen, 2009.
- 91 Lombardi, M.S., Kavelaars, A., Schedlowski, M., Bijlsma, J.W., Okihara, K.L., Van de Pol, M., Ochsmann, S., Pawlak, C., Schmidt, R.E. & Heijnen, C.J. Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. *Faseb J* 1999, 13(6), 715-725.
- 92 Lorton, D., Hewitt, D., Bellinger, D.L., Felten, S.Y. & Felten, D.L. Noradrenergic reinnervation of the rat spleen following chemical sympathectomy with 6-hydroxydopamine: pattern and time course of reinnervation. *Brain Behav Immun* 1990, 4(3), 198-222.
- 93 Lorton, D., Lubahn, C., Klein, N., Schaller, J. & Bellinger, D.L. Dual role for noradrenergic innervation of lymphoid tissue and arthritic joints in adjuvant-induced arthritis. *Brain Behav Immun* 1999, 13(4), 315-334.
- 94 Lubahn, C.L., Schaller, J.A., Bellinger, D.L., Sweeney, S. & Lorton, D. The importance of timing of adrenergic drug delivery in relation to the induction and onset of adjuvant-induced arthritis. *Brain Behav Immun* 2004, 18(6), 563-571.
- 95 Madden, K.S., Felten, S.Y., Felten, D.L., Sundaresan, P.R. & Livnat, S. Sympathetic neural modulation of the immune system. I. Depression of T cell immunity in vivo and vitro following chemical sympathectomy. *Brain Behav Immun* 1989, 3(1), 72-89.
- 96 Madden, K.S., Moynihan, J.A., Brenner, G.J., Felten, S.Y., Felten, D.L. & Livnat, S. Sympathetic nervous system modulation of the immune system. III. Alterations in T

- and B cell proliferation and differentiation in vitro following chemical sympathectomy. *J Neuroimmunol* 1994, 49(1-2), 77-87.
- 97 Magocsi, M., Vizi, E.S., Selmeczy, Z., Brozik, A. & Szelenyi, J. Multiple G-protein-coupling specificity of beta-adrenoceptor in macrophages. *Immunology* 2007, 122(4), 503-513.
  - 98 Malfait, A.M., Malik, A.S., Marinova-Mutafchieva, L., Butler, D.M., Maini, R.N. & Feldmann, M. The beta2-adrenergic agonist salbutamol is a potent suppressor of established collagen-induced arthritis: mechanisms of action. *J Immunol* 1999, 162(10), 6278-6283.
  - 99 Malysheva, O., Pierer, M., Wagner, U., Wahle, M. & Baerwald, C.G. Association between beta2 adrenergic receptor polymorphisms and rheumatoid arthritis in conjunction with human leukocyte antigen (HLA)-DRB1 shared epitope. *Ann Rheum Dis* 2008, 67(12), 1759-1764.
  - 100 Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R. & Weaver, C.T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006, 441(7090), 231-234.
  - 101 Mapp, P.I. Innervation of the synovium. *Ann Rheum Dis* 1995, 54(5), 398-403.
  - 102 Matsuzaki, T., Nakajima, A., Ishigami, S., Tanno, M. & Yoshino, S. Mirthful laughter differentially affects serum pro- and anti-inflammatory cytokine levels depending on the level of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006, 45(2), 182-186.
  - 103 Mauri, C. & Ehrenstein, M.R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. B cells. *Arthritis Res Ther* 2007, 9(2), 205.
  - 104 McDougall, J.J. Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain. *Arthritis Res Ther* 2006, 8(6), 220.
  - 105 McInnes, I.B. & Schett, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007, 7(6), 429-442.
  - 106 Messlinger, K. Functional morphology of nociceptive and other fine sensory endings (free nerve endings) in different tissues. *Prog Brain Res* 1996, 113, 273-298.
  - 107 Miura, T., Kudo, T., Matsuki, A., Sekikawa, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y. & Nakane, A. Effect of 6-hydroxydopamine on host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 2001, 69(12), 7234-7241.
  - 108 Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K. & Iwakura, Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 2003, 171(11), 6173-6177.
  - 109 Nance, D.M. & Sanders, V.M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun* 2007, 21(6), 736-745.
  - 110 New, D.C. & Wong, Y.H. Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *J Mol Signal* 2007, 2, 2.
  - 111 Newton, J.L., Harney, S.M., Wordsworth, B.P. & Brown, M.A. A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2004, 5(3), 151-157.



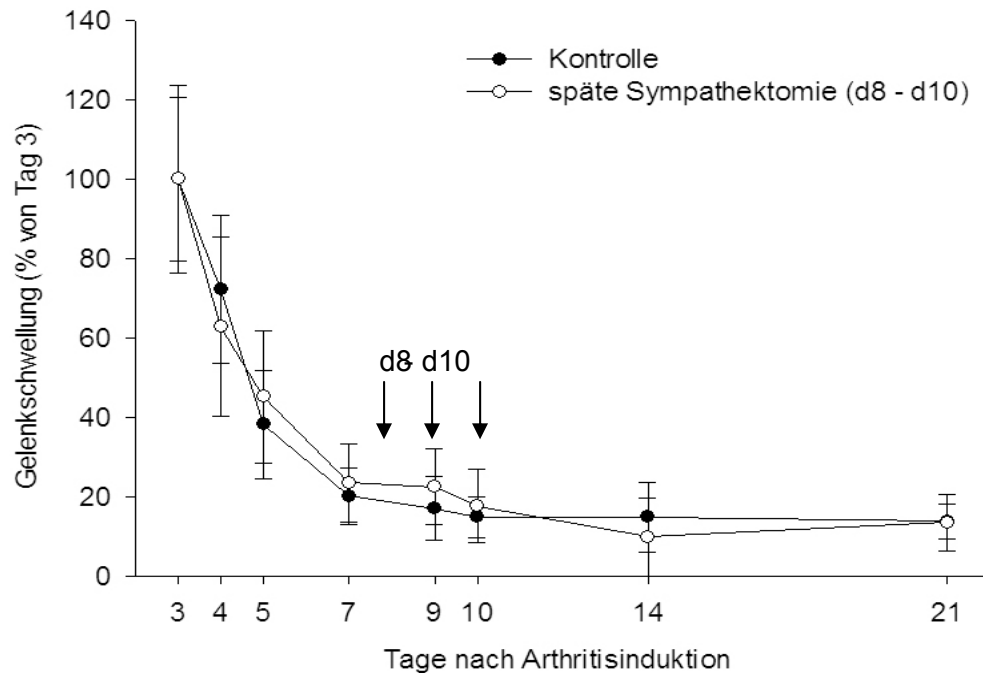
- 112 Nissler, K., Pohlers, D., Huckel, M., Simon, J., Bräuer, R. & Kinne, R.W. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen induced arthritis: influence on macrophage activation. *Ann Rheum Dis* 2004, 63(11), 1470-1477.
- 113 Ollendorf, D.A., Klingman, D., Hazard, E. & Ray, S. Differences in annual medication costs and rates of dosage increase between tumor necrosis factor-antagonist therapies for rheumatoid arthritis in a managed care population. *Clin Ther* 2009, 31(4), 825-835.
- 114 Pal, E. & Tabira, T. Autonomic regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: the role of interferon-gamma. *Neuroimmunomodulation* 2002, 10(2), 80-84.
- 115 Panina-Bordignon, P., Mazzeo, D., Lucia, P.D., D'Ambrosio, D., Lang, R., Fabbri, L., Self, C. & Sinigaglia, F. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J Clin Invest* 1997, 100(6), 1513-1519.
- 116 Pearson, C.M. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956, 91(1), 95-101.
- 117 Petrow, P.K., Thoss, K., Katenkamp, D. & Bräuer, R. Adoptive transfer of susceptibility to antigen-induced arthritis into severe combined immunodeficient (SCID) mice: role of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Invest* 1996, 25(4), 341-353.
- 118 Pinto, L.G., Cunha, T.M., Vieira, S.M., Lemos, H.P., Verri, W.A., Jr., Cunha, F.Q. & Ferreira, S.H. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain* 2010, 148(2), 247-256.
- 119 Podojil, J.R. & Sanders, V.M. Selective regulation of mature IgG1 transcription by CD86 and beta 2-adrenergic receptor stimulation. *J Immunol* 2003, 170(10), 5143-5151.
- 120 Rice, P.A., Boehm, G.W., Moynihan, J.A., Bellinger, D.L. & Stevens, S.Y. Chemical sympathectomy increases numbers of inflammatory cells in the peritoneum early in murine listeriosis. *Brain Behav Immun* 2002, 16(6), 654-662.
- 121 Saal, J.G., Krimmel, M., Steidle, M., Gerneth, F., Wagner, S., Fritz, P., Koch, S., Zacher, J., Sell, S., Einsele, H. & Muller, C.A. Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope. *Arthritis Rheum* 1999, 42(7), 1485-1496.
- 122 Sanders, V.M., Baker, R.A., Ramer-Quinn, D.S., Kasprovicz, D.J., Fuchs, B.A. & Street, N.E. Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help. *J Immunol* 1997, 158(9), 4200-4210.
- 123 Sanders, V.M., Kasprovicz, D.J., Swanson-Mungerson, M.A., Podojil, J.R. & Kohm, A.P. Adaptive immunity in mice lacking the beta(2)-adrenergic receptor. *Brain Behav Immun* 2003, 17(1), 55-67.
- 124 Sanders, V.M. & Kohm, A.P. Sympathetic nervous system interaction with the immune system. *Int Rev Neurobiol* 2002, 52, 17-41.
- 125 Schaible, H.G., Richter, F., Ebersberger, A., Böttger, M.K., Vanegas, H., Natura, G., Vazquez, E. & Segond von Banchet, G. Joint pain. *Exp Brain Res* 2009, 196(1), 153-162.

- 
- 126 Schaible, H.G., Schmelz, M. & Tegeder, I. Pathophysiology and treatment of pain in joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2006, 58(2), 323-342.
- 127 Schaible, H.G. & Schmidt, R.F. Responses of fine medial articular nerve afferents to passive movements of knee joints. *J Neurophysiol* 1983, 49(5), 1118-1126.
- 128 Schaible, H.G. & Schmidt, R.F. Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. *J Neurophysiol* 1985, 54(5), 1109-1122.
- 129 Schaible, H.G. & Schmidt, R.F. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. *J Neurophysiol* 1988, 60(6), 2180-2195.
- 130 Schett, G., Stach, C., Zwerina, J., Voll, R. & Manger, B. How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008, 58(10), 2936-2948.
- 131 Schmidt, R., Lang, F. *Physiologie des Menschen*, Springer, 2007.
- 132 Schubert, D., Maier, B., Morawietz, L., Krenn, V. & Kamradt, T. Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice. *J Immunol* 2004, 172(7), 4503-4509.
- 133 Schwemmer, S., Beer, P., Scholmerich, J., Fleck, M. & Straub, R.H. Cardiovascular and pupillary autonomic nervous dysfunction in patients with rheumatoid arthritis - a cross-sectional and longitudinal study. *Clin Exp Rheumatol* 2006, 24(6), 683-689.
- 134 Segond von Banchet, G., Böttger, M.K., Fischer, N., Gajda, M., Bräuer, R. & Schaible, H.G. Experimental arthritis causes tumor necrosis factor-alpha-dependent infiltration of macrophages into rat dorsal root ganglia which correlates with pain-related behavior. *Pain* 2009, 145(1-2), 151-159.
- 135 Selmeczy, Z., Szelenyi, J. & Vizi, E.S. Intact noradrenaline transporter is needed for the sympathetic fine-tuning of cytokine balance. *Eur J Pharmacol* 2003, 469(1-3), 175-181.
- 136 Sheibanie, A.F., Khayrullina, T., Safadi, F.F. & Ganea, D. Prostaglandin E2 exacerbates collagen-induced arthritis in mice through the inflammatory interleukin-23/interleukin-17 axis. *Arthritis Rheum* 2007, 56(8), 2608-2619.
- 137 Shigeyama, Y., Pap, T., Kunzler, P., Simmen, B.R., Gay, R.E. & Gay, S. Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000, 43(11), 2523-2530.
- 138 Smolen, J.S. & Steiner, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2003, 2(6), 473-488.
- 139 Stahl, H.D., Hubner, B., Seidl, B., Liebert, U.G., van der Heijden, I.M., Wilbrink, B., Kraan, M.C., Emmrich, F. & Tak, P.P. Detection of multiple viral DNA species in synovial tissue and fluid of patients with early arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000, 59(5), 342-346.
- 140 Straub, R.H. Complexity of the bi-directional neuroimmune junction in the spleen. *Trends Pharmacol Sci* 2004, 25(12), 640-646.
- 141 Straub, R.H., Rauch, L., Fassold, A., Lowin, T. & Pongratz, G. Neuronally released sympathetic neurotransmitters stimulate splenic interferon-gamma secretion from T

- cells in early type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2008, 58(11), 3450-3460.
- 142 Suberville, S., Bellocq, A., Fouqueray, B., Philippe, C., Lantz, O., Perez, J. & Baud, L. Regulation of interleukin-10 production by beta-adrenergic agonists. *Eur J Immunol* 1996, 26(11), 2601-2605.
- 143 Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K.H. & Lavelle, E.C. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2006, 203(7), 1685-1691.
- 144 Swanson, M.A., Lee, W.T. & Sanders, V.M. IFN-gamma production by Th1 cells generated from naive CD4+ T cells exposed to norepinephrine. *J Immunol* 2001, 166(1), 232-240.
- 145 Szelenyi, J., Selmeczy, Z., Brozik, A., Medgyesi, D. & Magocsi, M. Dual beta-adrenergic modulation in the immune system: stimulus-dependent effect of isoproterenol on MAPK activation and inflammatory mediator production in macrophages. *Neurochem Int* 2006, 49(1), 94-103.
- 146 Szelenyi, J. & Vizi, E.S. The catecholamine cytokine balance: interaction between the brain and the immune system. *Ann N Y Acad Sci* 2007, 1113, 311-324.
- 147 Tascioglu, F., Durak, B., Oner, C. & Artan, S. Trisomy 7 in synovial fluid cells of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2005, 25(8), 571-575.
- 148 Tato, C.M. & O'Shea, J.J. Immunology: what does it mean to be just 17? *Nature* 2006, 441(7090), 166-168.
- 149 Tracey, K.J. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol* 2009, 9(6), 418-428.
- 150 Tran, C.N., Lundy, S.K., White, P.T., Endres, J.L., Motyl, C.D., Gupta, R., Wilke, C.M., Shelden, E.A., Chung, K.C., Urquhart, A.G. & Fox, D.A. Molecular interactions between T cells and fibroblast-like synoviocytes: role of membrane tumor necrosis factor-alpha on cytokine-activated T cells. *Am J Pathol* 2007, 171(5), 1588-1598.
- 151 Tsao, C.W., Cheng, J.T., Shen, C.L. & Lin, Y.S. 6-Hydroxydopamine induces thymocyte apoptosis in mice. *J Neuroimmunol* 1996, 65(2), 91-95.
- 152 van den Berg, W.B., Joosten, L.A. & van Lent, P.L. Murine antigen-induced arthritis. *Methods Mol Med* 2007, 136, 243-253.
- 153 van Maanen, M.A., Lebre, M.C., van der Poll, T., LaRosa, G.J., Elbaum, D., Vervoordeldonk, M.J. & Tak, P.P. Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors attenuates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 2009, 60(1), 114-122.
- 154 van Meurs, J.B., Uitterlinden, A.G., Stolk, L., Kerkhof, H.J., Hofman, A., Pols, H.A. & Bierma-Zeinstra, S.M. A functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene is associated with osteoarthritis-related pain. *Arthritis Rheum* 2009, 60(2), 628-629.
- 155 Vandenbroeck, K., Alloza, I., Gadina, M. & Matthys, P. Inhibiting cytokines of the interleukin-12 family: recent advances and novel challenges. *J Pharm Pharmacol* 2004, 56(2), 145-160.
- 156 Vermeire, K., Heremans, H., Vandeputte, M., Huang, S., Billiau, A. & Matthys, P. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol* 1997, 158(11), 5507-5513.

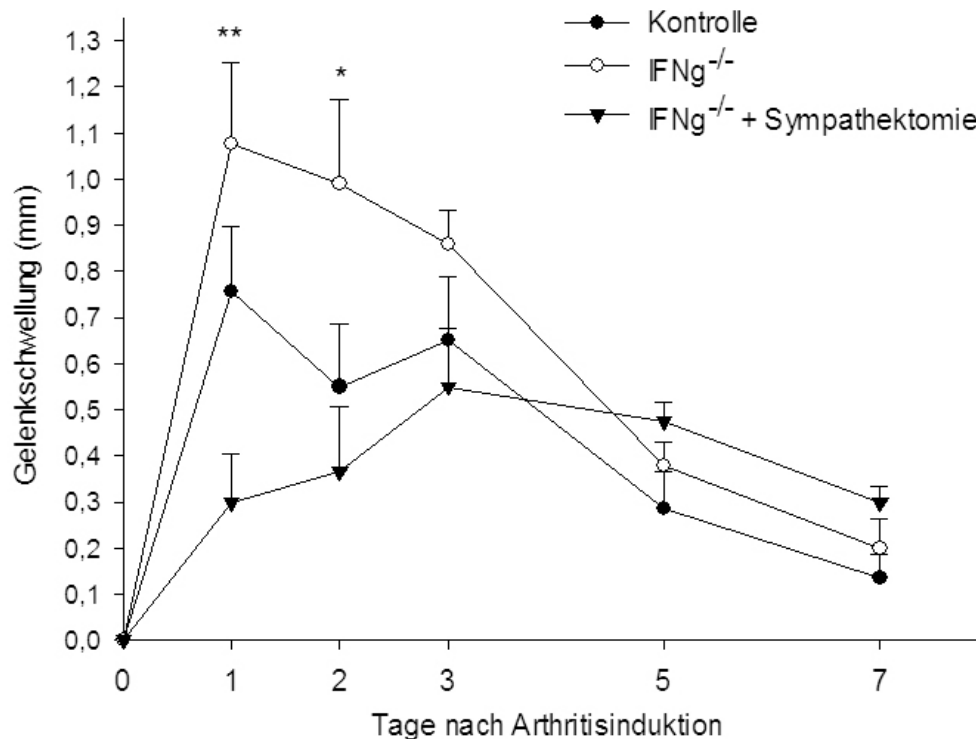
- 157 Verri, W.A., Jr., Cunha, T.M., Magro, D.A., Domingues, A.C., Vieira, S.M., Souza, G.R., Liew, F.Y., Ferreira, S.H. & Cunha, F.Q. Role of IL-18 in overt pain-like behaviour in mice. *Eur J Pharmacol* 2008, 588(2-3), 207-212.
- 158 Verri, W.A., Jr., Cunha, T.M., Magro, D.A., Domingues, A.C., Vieira, S.M., Souza, G.R., Liew, F.Y., Ferreira, S.H. & Cunha, F.Q. Role of IL-18 in overt pain-like behaviour in mice. *Eur J Pharmacol* 2008, 588(2-3), 207-212.
- 159 Verri, W.A., Jr., Cunha, T.M., Parada, C.A., Poole, S., Cunha, F.Q. & Ferreira, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* 2006, 112(1), 116-138.
- 160 Verri, W.A., Jr., Guerrero, A.T., Fukada, S.Y., Valerio, D.A., Cunha, T.M., Xu, D., Ferreira, S.H., Liew, F.Y. & Cunha, F.Q. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105(7), 2723-2728.
- 161 Wahle, M., Hanefeld, G., Brunn, S., Straub, R.H., Wagner, U., Krause, A., Häntzschel, H. & Baerwald, C.G. Failure of catecholamines to shift T-cell cytokine responses toward a Th2 profile in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006, 8(5), R138.
- 162 Waldburger, J.M. & Firestein, G.S. Garden of therapeutic delights: new targets in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009, 11(1), 206.
- 163 WHO. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. <http://www.who.int/classifications/icd/en/>, 2007.
- 164 Williams, J.M., Peterson, R.G., Shea, P.A., Schmedtje, J.F., Bauer, D.C. & Felten, D.L. Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: evidence for a functional link between the nervous and immune systems. *Brain Res Bull* 1981, 6(1), 83-94.
- 165 Witowski, J., Ksiazek, K. & Jorres, A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 2004, 61(5), 567-579.
- 166 Woolf, A. Major and Chronic Diseases Report. <http://ec.europa.eu>, 2007.
- 167 Woolf, C.J. & Salter, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 2000, 288(5472), 1765-1769.

## 6. Anhang - Abbildungen



**Abb. 49 Einfluss der Sympathektomie auf die chronische Phase der AIA**

Die Tiere wurden in der chronischen Entzündungsphase an den Tagen 8 und 10 (Pfeile) nach Auslösen der AIA mit 6-OHDA sympathektomiert.



**Abb. 50 AIA-Verlauf in sympathektomierten IFN $\gamma^{-/-}$  Mäusen**

Die IFN $\gamma^{-/-}$  Tiere wurden an den Tagen -1, 0 und 1 mit 150mg 6-OHDA/kg sympathektomiert (IFN $\gamma^{-/-}$  + Sympathektomie). Die Kontrolle stellen unbehandelte 67B6-Mäuse dar. Signifikanz: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 im Vergleich der Gruppen IFN $\gamma^{-/-}$  und IFN $\gamma^{-/-}$  + Sympathektomie.

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

	<i>Seite:</i>
<b>Abb. 1</b>	Gelenkverformungen der RA 3
<b>Abb. 2</b>	Zelluläre Interaktionen in der Pathogenese der RA 6
<b>Abb. 3</b>	Sympathische Innervation von lymphatischen Organen über postganglionäre Neurone 15
<b>Abb. 4</b>	Immunisierungsschema der Antigen-induzierten Arthritis 28
<b>Abb. 5</b>	Dynamic Plantar Aesthesiometer 39
<b>Abb. 6</b>	Plantar Test nach Hargreaves 39
<b>Abb. 7</b>	Einfluss der chemischen Sympathektomie auf die Milz 41
<b>Abb. 8</b>	Einfluss der chemischen Sympathektomie auf den Gehalt an Tyrosin-Hydroxylase 42
<b>Abb. 9</b>	Einfluss der chemischen Sympathektomie auf das Gewicht der Versuchstiere 43
<b>Abb. 10</b>	Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der chemischen Sympathektomie 44
<b>Abb. 11</b>	Bestimmung der effektiven 6-OHDA- Konzentration 45
<b>Abb. 12</b>	Zeitschema der Sympathektomie im Verlauf der AIA 45
<b>Abb. 13</b>	Neonatale Sympathektomie 46
<b>Abb. 14</b>	Langzeitsympathektomie 47
<b>Abb. 15</b>	Histologie der AIA am Tag 7 47
<b>Abb. 16</b>	Intraartikuläre 6-OHDA-Applikation 48
<b>Abb. 17</b>	Einfluss der Sympathektomie in der akuten Phase der AIA 49
<b>Abb. 18</b>	Histologie der AIA am Tag 3 50
<b>Abb. 19</b>	Immunglobuline (IgG) im Serum während der akuten Phase der AIA (d3) 51
<b>Abb. 20</b>	Proliferationsassay 52
<b>Abb. 21</b>	Zytokine in Überständen von Milz- und Lymphknotenzellen 53
<b>Abb. 22</b>	Einfluss der Sympathektomie auf das Zytokinprofil von Lymphozyten (d3) 54
<b>Abb. 23</b>	Einfluss der Sympathektomie auf die chronische Phase der AIA 55
<b>Abb. 24</b>	Einfluss der Sympathektomie auf die Flare-up-Reaktion der AIA 56
<b>Abb. 25</b>	Histologische Bewertung der Flare-Up-Reaktion am Tag 34 (d13 Flare-up) 57
<b>Abb. 26</b>	Einfluss der primären Sympathektomie auf die Flare-up-Reaktion 57
<b>Abb. 27</b>	Einfluss von Bupropion auf den Verlauf der AIA 58
<b>Abb. 28</b>	Mechanische Hyperalgesie im Verlauf der AIA 61

<b>Abb. 29</b>	Mechanische Hyperalgesie in der Flare-up-Reaktion	62
<b>Abb. 30</b>	Thermischer Stimulus bei nicht-arthritischen Tieren	63
<b>Abb. 31</b>	Thermische Hyperalgesie im Verlauf der AIA	63
<b>Abb. 32</b>	Schmerzabhängiges Verhalten im Verlauf der AIA	64
<b>Abb. 33</b>	Sympathischer Einfluss auf die Hyperalgesie in naiven Tieren	64
<b>Abb. 34</b>	Vitalität der Versuchstiere bei der AIA	66
<b>Abb. 35</b>	Einfluss der Antagonisten auf den Verlauf der AIA	67
<b>Abb. 36</b>	Histologische Bewertung der AIA am Tag 8	67
<b>Abb. 37</b>	Wirksamkeit von $\beta$ 1- und $\beta$ 2-Blockern auf die AIA	68
<b>Abb. 38</b>	$\beta$ -Adrenozeptoragonist und neonatale Sympathektomie	68
<b>Abb. 39</b>	Vitalitätstest	70
<b>Abb. 40</b>	Proliferationsassay	71
<b>Abb. 41</b>	Zytokinproduktion	72
<b>Abb. 42</b>	Aktivitätszustand der Makrophagen - Einfluss der Stimulation	73
<b>Abb. 43</b>	Aktivitätszustand der Makrophagen - Einfluss der $\beta$ -Antagonisten	74
<b>Abb. 44</b>	Aktivitätszustand der Makrophagen - Einfluss der $\beta$ -Agonisten	74
<b>Abb. 45</b>	Zytokinproduktion der Makrophagen - Einfluss der Antagonisten	75
<b>Abb. 46</b>	Zytokinproduktion der Makrophagen - Fokus auf IL-1 $\beta$ und IL-6	76
<b>Abb. 47</b>	Zytokinproduktion der Makrophagen - Einfluss der Agonisten	77
<b>Abb. 48</b>	G-Protein-vermittelter MAPK-Signaltransduktionsweg	94
<b>Abb. 49</b>	Einfluss der Sympathektomie auf die chronische Phase der AIA	111
<b>Abb. 50</b>	AIA-Verlauf in sympathektomierten IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Mäusen	111
<b>Tab. 1</b>	Adrenozeptoren	13
<b>Tab. 2</b>	Pharmaka, die auf das vegetative Nervensystem einwirken	13
<b>Tab. 3</b>	Histologisches Bewertungsschema	29
<b>Tab. 4</b>	Adrenozeptor-Antagonisten und -Agonisten	30
<b>Tab. 5</b>	Zusammensetzung Polyacrylamidgel	32
<b>Tab. 6</b>	ELISA-Antikörper	34
<b>Tab. 7</b>	ELISA-Standards	34
<b>Tab. 8</b>	Antikörper und Standards für Immunglobulin-ELISA	36

## **Danksagung**

Diese Promotionsarbeit wurde in der Arbeitsgruppe Immunpathologie am Institut für Pathologie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena in der Zeit von April 2006 bis Juni 2010 angefertigt.

Mein herzlichster Dank gilt Prof. Dr. Rolf Bräuer für die Überlassung des Themas und für seine Betreuung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Jörg Stirnweiß, Dr. Ingo Irmeler, Dr. René Eilenstein, Renate Stöckigt, Conny Hüttich und Steffi Stumpf danke ich für ihre Unterstützung und Hilfe in experimentellen Fragen sowie die freundliche und aufgeschlossene Arbeitsatmosphäre.

Besonders danke ich Dr. Mieczyslaw Gajda (Institut für Pathologie, FSU Jena) für die Bewertung der histologischen Schnitte sowie Prof. Dr. Hans-Georg Schaible und Dr. Michael Böttger (Institut für Physiologie, FSU Jena) für ihre fachliche Hilfe.

Außerdem möchte ich Dr. Klaus Bellstedt (Institut für klinische Chemie, FSU Jena) und Lars Jansen (AG Gynäkologische Molekularbiologie, Universitätsfrauenklinik Jena) für ihre technische Unterstützung danken.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie und meinen Freunden, die mir jeder Zeit zur Seite standen.



## **Erklärungen**

### **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne Inanspruchnahme unerlaubter fremder Hilfe angefertigt habe. Ich habe nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen zur Anfertigung dieser Arbeit eingesetzt und alle Materialien oder Dienstleistungen, die ich von Dritten erhalten habe, als solche gekennzeichnet.

Jena, den 07.06.2010

---

Matthias Ebbinghaus

### **Erklärung zur Dissertation**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung des Verfahrens zum Erwerb des o.g. Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt.

Jena, den 07.06.2010

---

Matthias Ebbinghaus